



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/55, C12P 11/00, C12M 1/40</b>	<b>A1.</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 98/18941</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 7 mai 1998 (07.05.98)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/01913 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 24 octobre 1997 (24.10.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/13077 25 octobre 1996 (25.10.96) FR <b>(71) Déposant:</b> RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE [FR/FR]; 42, avenue Aristide Briand, F-92160 Antony (FR). <b>(72) Inventeurs:</b> FAVRE-BULLE, Olivier; 113, rue Baraban, F-69003 Lyon (FR). PIERRARD, Jérôme; Bâtiment B, 3, rue Hector Berlioz, F-69009 Lyon (FR). DAVID, Christophe; 12, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). MOREL, Philippe; L'Orée du Village, F-38200 Chuzelles (FR). HORBEZ, Dominique; 4, rue des Longues Raies, F-95130 Franconville (FR). <b>(74) Mandataire:</b> LE PENNEC, Magali; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR PREPARING 2-HYDROXY 4-METHYLTHIO BUTYRIC ACID USING A NITRILASE <b>(54) Titre:</b> PROCEDE DE PREPARATION DE L'ACIDE 2-HYDROXY 4-METHYLTHIO BUTYRIQUE PAR UTILISATION D'UNE NITRILASE <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a method for preparing 2-hydroxy 4-methylthio butyric acid and/or the ammonium salt of 2-hydroxy 4-methylthio butyric acid by enzymatic hydrolysis of 2-hydroxy 4-methylthio butyronitrile characterised in that: a) in a first step a biological material having nitrilase activity is prepared, b) in a second step it is immobilised, c) in a third step, 2-hydroxy 4-methylthio butyronitrile is brought in the presence of the immobilised biological material, for obtaining the ammonium salt of 2-hydroxy 4-methylthio butyric acid, d) in a fourth step, optionally, the salt obtained in step c) is transformed into the corresponding acid, and e) in a fifth step, the product resulting from step c) or d) is concentrated.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Cette invention a pour objet un procédé de préparation de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique et/ou du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique par hydrolyse enzymatique du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile caractérisé en ce que: a) dans une première étape on prépare un matériel biologique ayant une activité nitrilase, b) dans une deuxième étape, on l'immobilise, c) dans une troisième étape, on met en présence le 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile avec le matériel biologique ainsi immobilisé, pour obtenir le sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique, d) dans une quatrième étape, éventuellement, on convertit le sel obtenu à l'étape c) en l'acide correspondant, et e) dans une cinquième étape, on concentre le produit obtenu à l'étape c) ou d).</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Procédé de préparation de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique  
par utilisation d'une nitrilase

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation  
de l'acide 2-hydroxy 4-(méthylthio) butanoïque (HMTBA) et/ou de son sel  
5 d'ammonium (HMTBS).

L'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique et ses sels sont utilisés  
depuis longtemps dans l'alimentation animale en remplacement de la  
méthionine. Il ou ils présentent l'avantage sur cette dernière de se présenter  
sous une forme liquide ce qui facilite leur utilisation par les sociétés  
10 productrices d'aliments.

Il est connu depuis longtemps de préparer l'acide 2-hydroxy 4-  
(méthylthio) butanoïque par voie chimique. On peut ainsi citer les brevets EP-  
142 488, EP-143 000 qui décrivent l'hydrolyse du 2-hydroxy 4-méthylthio  
hydroxybutyronitrile (HMTBN) par un procédé en deux étapes. La première  
15 étape consiste à mettre en contact le 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile  
avec un acide minéral fort tel que l'acide chlorhydrique ou sulfurique. Dans  
une étape ultérieure, après dilution à l'eau, l'hydrolyse est complétée à une  
température plus élevée. L'acide 2-hydroxy 4-(méthylthio) butanoïque est  
ensuite extrait avec un solvant organique peu miscible à l'eau tel qu'une  
20 cétone, de préférence la méthylisobutyl cétone puis le solvant est éliminé par  
évaporation. Ce type de procédé, utilisé au niveau industriel, comporte  
néanmoins quelques inconvénients. Il produit une quantité molaire de sulfate  
d'ammonium au moins égale à la quantité molaire de nitrile introduite qui doit  
être éliminé, générant ainsi un déchet industriel allant à l'encontre d'une  
25 politique de protection de l'environnement. Ce procédé nécessite aussi  
l'utilisation de quantités importantes de solvant qu'il est absolument  
nécessaire de recycler.

D'autres procédés tels que ceux décrits dans les brevets  
US 3 773 927 et 4 353 924 consistent à hydrolyser le 2-hydroxy 4-méthylthio  
30 butyronitrile avec de l'acide chlorhydrique puis à concentrer le milieu avec  
séparation du chlorure d'ammonium formé. Le sel obtenu est aussi difficile à

éliminer que le sel précédent et de plus l'acide obtenu présente une forte coloration.

Il est encore décrit dans le brevet EP 330 521 un procédé d'hydrolyse chimique du méthylthio hydroxypropionitrile qui consiste, comme  
5 précédemment, à réaliser une hydrolyse en milieu sulfurique. Le mélange est partiellement neutralisé avec de l'ammoniaque. Une séparation biphasique apparaît. La phase organique contient la majorité de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique et la phase aqueuse contient la majorité du sulfate d'ammonium produit. La solution organique après évaporation de l'eau  
10 contenue est filtrée de façon à récupérer le sulfate d'ammonium dissous. L'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique est ensuite dilué avec un peu d'eau et stabilisé avec un peu d'acide sulfurique. La solution aqueuse après élimination de l'eau permet d'obtenir du sulfate d'ammonium directement commercialisable. Ce procédé résoud en partie les inconvénients des  
15 procédés de l'art antérieur en ce qui concerne l'usage de solvants organiques mais ne résoud en rien les problèmes liés aux rejets des sels minéraux.

Parmi les brevets relatifs aux sels de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique, on peut citer les brevets US 2 745 745, 2 938 053 et 3 175 000  
20 concernant les sels de calcium et/ou d'ammonium. Le mélange obtenu par hydrolyse du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile est traité avec de l'hydroxyde ou du carbonate de calcium. Le sulfate de calcium est alors précipité libérant l'ammoniaque qui forme le sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique. Ici encore le problème qui consiste à éliminer  
25 le sulfate de calcium subsiste.

Il est encore décrit dans la demande de brevet WO 96/01808 un procédé qui consiste à pratiquer une hydrolyse et une extraction par un solvant organique comme dans le premier document de l'art antérieur cité puis une neutralisation de la solution organique par de l'ammoniaque. Ce  
30 procédé, comme la majorité des procédés précédemment décrits, aboutit à la formation d'au moins une mole de sulfate ou de chlorure d'ammonium par mole de nitrile introduite et exige le recyclage de quantités importantes de

solvant organique. Il ne peut permettre d'obtenir une solution de sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique à un coût industriellement intéressant.

5 Il est en outre décrit dans WO96/09403 l'utilisation d'une nitrilase comme catalyseur d'hydrolyse d'un groupe nitrile en groupe carboxylique. Le procédé décrit dans ce document n'est toutefois pas utilisable à l'échelle industrielle, compte tenu de l'activité insuffisante des microorganismes qui synthétisent ces nitrilases.

10 On a maintenant découvert grâce au procédé de l'invention qu'en mettant en oeuvre plusieurs étapes spécifiques, il était possible d'obtenir l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio-butanoïque et/ou son sel d'ammonium par voie enzymatique à l'échelle industrielle, avec un rendement élevé, sans utilisation de solvants et sans production concomitante de sels minéraux.

15 L'invention a pour objet un procédé de préparation de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique et/ou du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique par hydrolyse enzymatique du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile caractérisé en ce que :

- a) dans une première étape on prépare un matériel biologique ayant une activité nitrilase,
- 20 b) dans une deuxième étape, on l'immobilise,
- c) dans une troisième étape, on met en présence le 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile avec le matériel biologique ainsi immobilisé, pour obtenir le sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique,
- d) dans une quatrième étape, éventuellement, on convertit le sel
- 25 obtenu à l'étape c) en l'acide correspondant, et
- e) dans une cinquième étape, on concentre le produit obtenu à l'étape c) ou d).

L'invention sera expliquée de façon détaillée dans la description qui suit pour laquelle on se reportera aux figures annexées sur lesquelles :

- 30 - la figure 1 représente un schéma d'une cellule d'électrodialyse employée à l'étape facultative d) ; la figure 1A représente une cellule d'électrodialyse à membrane bipolaire à trois compartiments ; la figure 1B

représente une cellule d'électrodialyse à membrane bipolaire à deux compartiments.

- la figure 2 représente un schéma d'une installation pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention ;

5       - la figure 3 représente la carte de restriction des plasmides pRPA-BCAT1 à 5.

10       - la figure 4 représente la stratégie de séquençage du fragment de 1130 pb contenant la séquence d'ADN (dénommée sur la figure nitB) codant pour le polypeptide ayant l'activité nitrilase selon l'invention. Les numéros se réfèrent à l'identité des amorces utilisées pour le séquençage ainsi que les notations M13FWD et M13REV.

- la figure 5 représente la carte de restriction des plasmides pRPA-BCAT12 et pRPA-BCAT13.

15       - la figure 6 représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE à 10 % montrant l'expression des séquences d'ADN selon l'invention dans les souches *E. coli* BL21(DE3)/pRPA-BCAT12, BL21(DE3)/pRPA-BCAT13, BL21(DE3)/pRPA-BCAT12 + pXL2231, BL21(DE3)/pRPA-BCAT13 + pXL2231. Chaque piste correspond à une quantité de protéines solubles de 10 µg et un volume équivalent de fraction brute et insoluble.

20       - la figure 7 représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE à 10 % montrant l'expression de la séquence d'ADN de référence selon l'invention dans les souches *E. coli* DH5α/pRPA-BCAT3, DH5α/pRPA-BCAT6, DH5α/pRPA-BCAT6 + pXL2035, RPA-BIOCAT76. Chaque piste correspond à une quantité de protéines solubles de 10 µg et un volume équivalent de fraction  
25 brute et insoluble.

- la figure 8 représente la carte de restriction du plasmide pRPA-BCAT14.

30       - la figure 9 représente l'électrophorèse sur gel SDS-PA à 10 % montrant l'expression des séquences d'ADN selon l'invention dans les souches *P. putida* G2081 (pRPA-BCAT14), G2081 (pRPA-BCAT23), G2081 (pRPA-BCAT24), *A. faecalis* ATCC8750 (pRPA-BCAT14), *A. faecalis* ATCC8750 (pRPA-BCAT23), *A. faecalis* ATCC8750 (pRPA-BCAT24).

Chaque piste correspond à une quantité de protéines solubles de 10 µg et un volume équivalent de fraction brute et éventuellement insoluble.

- la figure 10 représente la carte de restriction du plasmide pCGL1087.
- la figure 11 représente la carte de restriction du plasmide pOS48.7.

- 5            La première étape consiste à préparer le matériel biologique ayant une activité nitrilase.

Le matériel biologique peut consister en une solution enzymatique telle quelle ou des cellules entières ou brisées ayant une activité nitrilase.

- 10            Avantageusement, on utilise un microorganisme exprimant une nitrilase.

La nitrilase peut notamment être issue d'un microorganisme, en particulier un microorganisme du genre *Alcaligenes*, *Rhodococcus* ou *Gordona*, notamment *Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus* sp. HT 29-7, *Gordona terrae*, de préférence les souches décrites dans WO 96/09403.

- 15            On utilise avantageusement un microorganisme exprimant une activité nitrilase obtenue par transfert de l'information génétique codant pour la nitrilase d'un micro-organisme parental dans un microorganisme hôte. En particulier, chez *E. coli*, on peut utiliser la coexpression des protéines chaperonnes Gro ESL pour améliorer les performances de la souche
- 20            recombinante.

A cet effet, on utilise tout vecteur d'expression approprié, notamment un vecteur plasmidique.

- La séquence nucléotidique utilisée dans ce cas sera alors placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.
- 25            L'hôte cellulaire utilisé peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries Gram positif ou Gram négatif ou eucaryotes, comme par exemple les levures, les champignons ou tout autre système. Les signaux contrôlant l'expression des polypeptides sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, l'ADN codant pour une nitrilase peut être

insérée dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les constructions en résultant peuvent être introduites dans un hôte approprié par des méthodes standard telles que l'électroporation.

A titre de microorganisme hôte, on peut citer en particulier *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, ou les microorganismes du genre *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Penicillium* et *Aspergillus*.

Un vecteur préféré pour l'expression chez *E. coli* est le plasmide pRPA-BCAT6.

La deuxième étape du procédé consiste à immobiliser le matériel biologique. Cette immobilisation se fait avantageusement en présence d'un support solide et permet d'obtenir des particules solides dont la taille, la forme et la résistance mécanique peuvent être contrôlées. Elle permet aussi l'emploi simultané de polymère de polyazétidine et d'autres agents réticulants.

Ce procédé d'immobilisation peut faire intervenir des cellules entières ou perméabilisées. Il peut aussi s'appliquer à une solution enzymatique exempte de cellules.

Les enzymes utilisées pour l'immobilisation sont les nitrilases.

Le procédé d'immobilisation consiste à immobiliser le matériel biologique actif sur un support solide, de granulométrie notamment comprise entre 1  $\mu\text{m}$  et 3 mm, de préférence 10  $\mu\text{m}$  et 2 mm, grâce à des agents chimiques réagissant avec les fonctions amine ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}$ ), carboxyle ( $\text{COOH}$ ), hydroxy ( $\text{OH}$ ), thiol ( $\text{SH}$ ) ou amide ( $\text{CONH}_2$ ) de l'agent biologique et du support. Ces agents chimiques permettent aussi d'insolubiliser dans l'eau le matériel biologique et le support. La masse obtenue est très maléable et peut être mise en forme afin d'obtenir des particules de forme et de taille



souhaitées. La cohésion et la dureté de ces particules sont ensuite obtenues par séchage.

Le matériel biologique à immobiliser peut éventuellement contenir également un matériel biologique inactif présent à raison de 0 à 200 % en poids. Ce matériel inactif biologique peut être des protéines (albumine, 5 gélatine) ou des polysaccharides (Chitosan, k-carraghénane, alginate).

Le support inerte sur lequel est déposé le matériel biologique et le polymère peut se composer de particules organiques ou inorganiques, poreuses ou non poreuses, hydrophiles ou hydrophobes. Parmi ces 10 particules on peut signaler sans que cela soit limitatif :

- les résines échangeuses d'ions,
- l'alumine,
- les silices de synthèse ou diatomées et les gels de silice,
- les zéolites,
- 15 - les charbons,
- les protéines insolubles dans l'eau, comme le gluten,
- les polysaccharides, comme l'amidon.

Le support inerte peut être ajouté à raison de 0,01 à 500% en poids du matériel biologique et de préférence de 10 à 200 %.

20 Les agents chimiques utilisés pour insolubiliser le matériel biologique peuvent être des polymères ou des molécules bifonctionnalisées qui réagissent avec les fonctions amine ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}$ ), carboxylique ( $\text{COOH}$ ), hydroxy ( $\text{OH}$ ), thiol ( $\text{SH}$ ), amide ( $\text{CONH}_2$ ). On peut citer :

- les polymères de polyazétidine,
- 25 - les polymères de polyéthylèneimine,
- les polymères de polyamide,
- les polymères d'isocyanates,
- les gels d'alginate,
- les gels de k-carraghénane,
- 30 - les amines comme l'hexaméthylène diamine,
- les aldéhydes comme le glutaraldéhyde,
- les acides carboxyliques comme l'acide adipique, et

– les isocyanates.

Le procédé d'immobilisation peut faire intervenir un ou plusieurs de ces agents chimiques. L'agent chimique est ajouté selon une concentration comprise entre 1 et 50 % en poids par rapport au matériel biologique et au support. On préférera une quantité comprise entre 5 et 30 % afin d'obtenir des particules suffisamment solides et qui conservent une activité importante et qui ne présentent pas trop de problèmes de diffusion interne.

La durée du traitement de réticulation est comprise entre 0,5 et 24 heures.

La température du procédé est généralement comprise entre 4 et 65°C. On préférera une température comprise entre 20 et 40°C. La température employée lors du procédé d'immobilisation peut être aussi très dépendante de la stabilité du matériel biologique employé.

Le pH durant la phase d'immobilisation est maintenu entre 5 et 11. On préférera un pH compris entre 6 et 10 avec une préférence vers les pH alcalins. Le pH est aussi choisi en fonction de la résistance du matériel biologique et sera aisément déterminé par l'homme du métier.

La mise en forme du biocatalyseur doit permettre son emploi dans un système quelconque, notamment dans un lit fixe.

20

Une méthode de formulation peut être l'extrusion. Pour ce faire, le matériel biologique et le support sont réticulés par ajout d'un ou plusieurs agents chimiques. Après traitement, la masse insoluble est récupérée par centrifugation ou après floculation et filtration. Un taux de matière sèche d'au moins 10% est préféré. La masse est ensuite extrudée. Par cette méthode, on obtient de préférence des vermicelles de diamètre compris entre 0,3 et 0,5 mm et d'une longueur comprise entre 1 et 10 mm. Ces vermicelles peuvent être sphéronisés. Les particules obtenues sont ensuite séchées.

30

Une autre méthode de formulation peut être le pelliculage ("spray

coating"). Pour ce faire, le matériel biologique est mélangé avec un ou plusieurs agents chimiques. Après réaction, le mélange est pulvérisé sur le support sous forme d'une couche mince. Par cette méthode, on obtient des granulés de diamètre moyen compris entre 0,1 et 2 mm.

- 5 Les particules obtenues peuvent éventuellement être ensuite plongées dans une solution d'un agent réducteur comme le borohydrure de sodium afin de réduire les fonctions imines formées lors de la réticulation.

10 Les particules obtenues sont suffisamment solides et résistantes à l'attrition pour être employées dans un lit-fixe, un lit fluidisé ou un réacteur agité.

La troisième étape du procédé selon l'invention consiste à mettre en oeuvre le matériel biologique immobilisé dans une ou plusieurs colonnes ou réacteurs. Le but de cette étape est de pouvoir produire en continu le sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthiobutyrique à partir du 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile.

La ou les colonnes ou réacteurs sont alimentées par une solution pure ou diluée du 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile ou un mélange contenant du 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile et du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthiobutyrique.

- 20 La ou les colonnes ou réacteurs sont mises en oeuvre de préférence à une température comprise entre 10 et 60°C et à un pH compris entre 5 et 9.

Le système mis en oeuvre peut être constitué de deux ou plusieurs colonnes connectées l'une à l'autre en série, avec selon une première manière de mettre en oeuvre l'invention, l'alimentation de la solution aqueuse du 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile en tête de la première colonne avec une alimentation simultanée des autres colonnes avec la solution du 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile en une quantité limitée à la solubilité de ce composé dans le mélange réactionnel ; ce système est intitulé système étagé. Selon une deuxième manière de mettre en oeuvre l'invention, on utilise une ou plusieurs colonnes connectées l'une à l'autre en parallèle dans

une boucle de circulation. Selon cette installation le 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile en solution aqueuse est alimentée en continu dans la boucle, et le milieu de réaction est pompé en continu de façon à conserver un volume constant dans la boucle ; ce système est intitulé système-boucle.

- 5 Le type de réacteur utilisé dans cette invention peut être du type lit fixe, lit fluide, ou du type agité en continu. On préfère utiliser les réacteurs du type lit fixe parce qu'ils réduisent les problèmes d'attrition qui peuvent être rencontrés avec les particules de cellules immobilisées. Si le microorganisme est utilisé tel quel, on préférera utiliser un réacteur agité couplé à un module  
10 d'ultrafiltration pour séparer de façon continue le microorganisme du produit d'intérêt.

La quatrième étape qui est une étape facultative consiste à convertir le sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthiobutyrique en l'acide correspondant. Cette étape peut être réalisée suivant deux méthodes :

- 15 - soit par électrodialyse au moyen d'un électrodialyseur à deux ou trois compartiments,  
- soit par chauffage de la solution aqueuse qui peut être suivi d'une extraction liquide/ liquide.

Suivant la méthode par électrodialyse, on emploiera un  
20 électrodialyseur à deux ou trois compartiments.

On entend par "compartiment", l'espace soit entre deux membranes, soit entre une membrane bipolaire et homopolaire, soit entre deux membranes homopolaires adjacentes. On entend par "cellule", un ensemble de deux ou trois compartiments. Un empilement comprend entre 5 et 300  
25 cellules. L'électrodialyseur est composé d'un empilement et comporte bien entendu une anode et une cathode.

Les membranes homopolaires pouvant être utilisées dans le cadre de l'invention se divisent en deux grandes familles, selon leur mode de fabrication.

30 Ainsi, on peut employer des membranes hétérogènes, préparées à partir de résines échangeuses d'ions, mélangées à un liant tel que le

polychlorure de vinyle, le polyéthylène ou autre. L'ensemble ainsi formé peut enduire une trame comme par exemple un tissu de polyester ou de polyacrylonitrile.

On peut utiliser également des membranes homogènes, obtenues par introduction d'un groupement fonctionnel sur un support inerte, par greffage chimique ou radiochimique. La méthode chimique la plus utilisée, consiste généralement à fonctionnaliser un latex d'un polymère comportant des noyaux aromatiques, tel que styrène/divinylbenzène ou styrène/butadiène. Le latex ainsi fonctionnalisé peut servir ensuite à enduire une trame comme pour les membranes hétérogènes. La méthode radiochimique comporte généralement le greffage, sous l'influence d'un rayonnement, d'un composé aromatique, tel que le styrène, sur un support inerte comme une feuille de polyéthylène ou de polytétrafluoroéthylène. Le noyau aromatique est ensuite fonctionnalisé comme dans la méthode chimique.

Les membranes échangeuses de cations comportent des groupements acides forts, le plus souvent des groupements sulfonates, ou des groupements acides faibles, souvent des groupes carboxylates. Plus rarement, les groupements acides peuvent être des groupements  $\text{PO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_2^-$ ,  $\text{AsO}_3^{2-}$ ,  $\text{SeO}_3^-$ .

Les membranes échangeuses d'anions comportent des groupements basiques forts, le plus souvent des groupements ammonium quaternaire, ou des groupements basiques faibles, le plus souvent des groupements amines. Plus rarement, les groupements basiques peuvent être des groupements phosphonium quaternaire ou des groupements sulfonium.

Dans le présent procédé, les membranes cationiques comportent de préférence des groupements acides forts et parmi ceux-ci préférentiellement des groupements sulfonates et les membranes anioniques comportent de préférence des groupements basiques forts et parmi ceux-ci des groupements ammonium quaternaire.

Les membranes bipolaires sont un assemblage de deux membranes, l'une cationique, l'autre anionique. Lorsque la membrane est soumise à un champ électrique suffisant, l'eau de solvatation à l'interface de la membrane

se dissocie en ions  $H^+$  et  $OH^-$ , qui migrent respectivement vers la cathode en traversant la face cationique et vers l'anode en traversant la face anionique. Comme membranes bipolaires, on peut citer à titre d'exemple les membranes commercialisées par les sociétés Aqualytics, Tokuyama Soda ou FuMaTech.

- 5 L'anode de l'électrodialyseur peut être constituée par des matériaux classiquement utilisés en électrodialyse, par exemple du graphite, du nickel ou du titane revêtu par des métaux précieux ou des oxydes de métaux précieux, notamment le titane platiné. La cathode peut également constituée par des matériaux classiquement utilisés en électrodialyse, par exemple du  
10 graphite, de l'acier inoxydable ou du nickel.

- L'électrodialyseur est alimenté avec la solution aqueuse à traiter. Il est également nécessaire de faire circuler à l'anode une solution d'un anolyte et à la cathode une solution d'un catolyte. On peut employer également une solution unique d'électrolyte. Dans le présent procédé, un circuit unique  
15 d'électrolyte convient bien. Le rôle de la solution d'électrolyte est d'assurer une conductivité suffisante. De préférence, cette conductivité sera égale ou supérieure à 20 millisiemens par centimètre (mS/cm), sans que cette limite inférieure soit à considérer comme critique pour la mise en oeuvre du procédé.

- 20 L'électrolyte mis en oeuvre est un composé ionisable tel qu'un sel, un acide ou une base. L'électrolyte est de préférence choisi parmi les composés non électroactifs. Ainsi par exemple, il est préférable d'utiliser des sels neutres comme les sulfates, des acides comme l'acide sulfurique, des bases comme la soude.

- 25 Les densités de courant appliquées sont généralement comprises entre 0,2 et 1,5 kA/m<sup>2</sup>, et de préférence entre 0,4 et 1kA/m<sup>2</sup>.

La température à laquelle est mis en oeuvre le procédé de l'invention se situe dans un domaine compatible avec la stabilité des membranes. On opérera de préférence à une température comprise entre 30 et 60°C.

- 30 L'électrodialyseur peut fonctionner de différentes façons. Il peut tout d'abord fonctionner en continu, la solution à traiter traversant en continu

l'empilement ; plusieurs étages sont alors disposés en série si le taux de traitement à obtenir l'exige. Il peut aussi fonctionner en discontinu, la solution à traiter recirculant sur une cuve jusqu'à ce que le taux de traitement souhaité soit obtenu. Enfin il peut fonctionner en passage direct avec

5 recirculation partielle.

Selon une première variante de l'invention, la dissociation du sel d'ammonium en acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque et en ammoniacque peut se faire dans une cellule d'électrodialyse à membranes bipolaires à trois compartiments telle que représentée schématiquement à la

10 figure 1A.

Un appareil d'électrodialyse convenable pour la mise en oeuvre du procédé est constitué par différents compartiments, délimités respectivement par des membranes cationiques (MC), des membranes bipolaires (MB) et des membranes anioniques (MA). Ces compartiments se divisent en

15 compartiment sel (S) qui s'appauvrissent en composés à séparer, en compartiment base (B) et acide (A) où se concentrent respectivement l'acide et la base régénérés à partir du sel.

Le sel d'ammonium est introduit dans le compartiment sel. Sous l'action du champ électrique, l'ion ammonium migre vers la cathode en sortant du compartiment (S) où il se trouve, à travers une membrane

20 échangeuse de cations (membrane cationique) et se combine avec les ions  $\text{OH}^-$  provenant de la face anionique de la membrane bipolaire, au sein de laquelle s'effectue la dissociation de l'eau sous l'effet du champ électrique.

Simultanément, les ions carboxylate (2-hydroxy 4-(méthylthio) butanoate) migrent vers l'anode en sortant du compartiment (S) où ils se trouvent, à travers une membrane échangeuse d'anions (membrane

25 anionique). Après passage dans le compartiment (A) suivant, ils sont protonés par l'apport d'ions  $\text{H}^+$  provenant de la face cationique de la membrane bipolaire. Les trois compartiments (B), (A), (S) adjacents forment

30 une cellule d'électrodialyse.

Dans une deuxième variante de l'invention, la régénération de l'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque peut se faire dans une cellule

d'électrodialyse à membranes bipolaires à deux compartiments telle que représentée à la figure 1B. Ces deux compartiments sont délimités respectivement par des membranes cationiques et des membranes bipolaires. Ces compartiments se divisent en compartiment sel/acide (S/A) et  
5 base (B).

Le sel d'ammonium est introduit dans le compartiment sel/acide. Sous l'action du champ électrique, l'ion ammonium migre vers la cathode en sortant du compartiment (S/A) où il se trouve, à travers une membrane échangeuse de cations (membrane cationique) et se combine avec les ions  
10  $\text{OH}^-$  provenant de la face anionique de la membrane bipolaire, au sein de laquelle s'effectue la dissociation de l'eau sous l'effet du champ électrique.

Simultanément, le compartiment S/A s'acidifie par l'apport des ions  $\text{H}^+$  provenant de la face cationique de la membrane bipolaire. Les deux compartiments (B) et (S/A) adjacents forment une cellule d'électrodialyse.

15 Cette configuration présente l'avantage d'une moindre consommation énergétique et permet de faire varier le rapport sel/acide souhaité.

Pour obtenir un bon fonctionnement de l'électrodyaliseur, la conductivité électrique du compartiment base (de même que celle du compartiment acide dans le cas de la configuration à trois compartiments),  
20 doit être suffisante et peut être ajustée par ajout d'un électrolyte support. Ainsi, la conductivité de la solution d'ammoniaque peut être augmentée par ajout d'un sel d'ammonium, comme le sulfate d'ammonium.

Dans une variante préférée de l'invention, on utilisera le 2-hydroxy 4-méthylthio butanoate d'ammonium.

25 Dans un mode de réalisation particulier envisageable dans le cadre de la présente invention, on introduit dans le compartiment sel d'une cellule d'électrodialyse à trois compartiments un mélange de sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthiobutyrique et de 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile. Le sel sera dissocié comme précédemment en 2-  
30 hydroxy 4-méthylthiobutyrate et migrera vers l'anode où il sera transformé en acide 2-hydroxy 4-méthylthiobutyrique, l'ion ammonium migrera vers la



cathode ou il sera transformé en ammoniacque, dans le compartiment sel subsistera l'eau et le 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile non transformé qui sera recyclé vers la colonne d'hydrolyse.

- 5            Suivant la méthode par chauffage, on récupère l'acide en déplaçant l'équilibre sel d'ammonium, acide libre en chauffant la solution aqueuse riche en HMTBS et en soutirant l'ammoniacque ainsi libérée. On peut y aboutir en chauffant sous vide ou à pression atmosphérique avec ou sans traitement par stripage. L'emploi de CO<sub>2</sub> sous pression peut être envisagé afin de
- 10   faciliter le déplacement de l'équilibre. On obtient un mélange d'HMTBS et d'HMTBA à raison de 5 à 99,9% d'HMTBA, et de préférence 10 à 50% d'HMTBA par rapport à la somme de l'HMTBA et l'HMTBS. Les viscosité de ces solutions sont comprises entre 1200 et 30 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (1200 et 30 cSt) et de préférence entre 200 et 50 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (200 et 50 cSt) à 25°C.
- 15            Les solutions aqueuses peuvent être décomposées par extraction de l'acide avec l'utilisation de produits solvants partiellement miscibles ou non à l'eau. Il existe un grand nombre de solvants possibles pour la séparation. Les solvants préférés sont les cétones de C5 à C8, en particulier la méthylisobutylcétone; les éthers comme l'isopropyléther; les alcools comme
- 20   isopropanol; les esters; les amines tertiaires comme la trioctylamine. Dans le cadre de l'invention, les solvants préférés sont: l'acétone, la MIBK, l'isopranoal, l'acétate d'isopropyle, l'éther isobutylique ou propylique ou le THF, la trioctyl amine. Le rapport de la phase aqueuse et de la phase organique n'est pas critique. Cependant, pour des raisons de degré
- 25   d'efficacité, on ne doit pas descendre en-dessous d'un rapport minimum de 1/1 et pour des raisons de rentabilité ne pas aller au delà d'un rapport de 1/3. On préférera un rapport 1/1,5 à 2,0.

- L'extraction peut être mise en oeuvre en batch ou en continu dans n'importe quel type de technologie d'extraction liquide-liquide. On peut
- 30   citer par exemple la cascade de mélangeurs décanteurs à co- ou contre courant, les extracteurs centrifuges, les colonnes garnies ou à plateaux, etc.

La solution aqueuse appauvrie en acide libre peut être de nouveau traitée et ce, autant de fois que souhaité jusqu'à complet épuisement de l'ammoniaque si désiré.

La phase organique est soumise à un traitement pour isoler l'HMTBA.

- 5 Ceci est réalisé de préférence par vaporisation du solvant ou par une extraction à l'eau chaude. Pour éviter une éventuelle détérioration de l'HMTBA, on pourra maintenir la sollicitation thermique aussi faible que possible par application d'un vide.

- 10 Dans ces deux procédés de dissociation du sel d'ammonium, on génère une solution aqueuse d'ammoniaque. Cette dernière peut être traitée afin de concentrer l'ammoniaque. On préférera la distillation et la concentration de l'ammoniaque en un ou plusieurs étages avec ou sans pression. Une étape préliminaire de stripage peut être envisagée. La solution concentrée d'ammoniaque peut être retournée dans la synthèse de l'acide
- 15 cyanhydrique qui rentre en jeu dans la synthèse du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile.

Dans la cinquième étape, on concentre la solution aqueuse d'HMTBS et/ou d'acide libre. Ceci est réalisé de préférence par évaporation de l'eau.

- 20 L'invention a également pour objet une installation pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention. Une telle installation est illustrée schématiquement à la figure 2 et comprend des conduites 1,2 destinées à introduire respectivement la cyanhydrine de l'AMTP et l'eau dans le réacteur 3. Le réacteur 3 est un lit fixe à recirculation qui est garni avec les souches
- 25 ou enzymes immobilisées. Une partie de la solution est soutirée du réacteur 3 et envoyée sur un réacteur finisseur 4. Le réacteur finisseur 4 est de type lit fixe garni avec les souches ou enzymes immobilisées. Une solution concentrée en HMTBS est ensuite récupérée en sortie du réacteur 4 via la
- 30 conduite 5.

Cette solution concentrée en HMTBS peut subir deux traitements totalement indépendants suivant le type de produit final souhaité.

Si l'on souhaite récupérer un produit contenant une forte proportion d'HMTBS, la solution de la conduite 5 est amenée dans un évaporateur 6 qui permet de concentrer le produit et l'on récupère dans la conduite 8 une solution concentrée composée principalement d'HMTBS et contenant un peu d'acide libre. L'eau en excès ainsi qu'une fraction de l'ammoniaque sont évacuées par la conduite 7.

Si l'on souhaite récupérer un produit contenant une forte proportion d'acide libre, la solution concentrée d'HMTBS de la conduite 5 est amenée dans un système d'électrodialyse bipolaire 9. Dans cet appareil, l'ammoniaque est plus ou moins séparée de l'acide par électrodialyse. Le mélange appauvri en ammonium est récupéré dans la conduite 11 puis concentré dans l'évaporateur 12 afin d'obtenir une solution concentrée composée principalement d'acide libre et contenant peu ou pas d'HMTBS. La solution riche en ammoniaque est soutirée par la conduite 10. L'ammoniaque est récupérée par un stripage 15.

Cet effluent d'ammoniaque peut être concentré par distillation 16, l'eau est récupérée en 18. La solution d'ammoniaque concentrée 17 peut être retournée à la synthèse de l'HCN.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

## 25 **EXEMPLES**

### **Exemple 1 : Purification et séquençage Nter de la nitrilase**

La nitrilase a été purifiée en quatre étapes. Le résumé de la purification est donné dans le tableau 1.

30 Les cellules de *Alcaligenes faecalis* sont cultivées 24 heures, à 30°C, dans un milieu minimum en présence de benzonitrile (0,5 g/l). Après centrifugation de la culture, le culot est repris dans du tampon TG (25 mM Tris-HCl, 10% (p/v) glycérol, pH 7,5). La suspension cellulaire est traitée aux

ultrasons puis centrifugée afin d'obtenir l'extrait brut. L'extrait brut est ensuite traité avec du sulfate d'ammonium jusqu'à 30% de la saturation. Le précipité obtenu est resuspendu dans du tampon TG puis dialysé contre 2 litres du même tampon durant une nuit. La solution obtenue est ensuite déposée sur

5 une colonne échangeuse d'anions Q Sepharose Fast Flow HR 26/ 10 préalablement équilibrée avec du tampon TG. L'activité est ensuite éluée avec un gradient de 0 à 1 M NaCl. Les fractions actives sont ensuite déposées sur une colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5

10 préalablement équilibrée avec du tampon TG. La nitrilase est éluée à l'aide d'un gradient de 0 à 1 M NaCl. Pour finir, les fractions contenant l'activité sont réunies, la concentration en sulfate d'ammonium est ensuite amenée à 1 M. Cette solution est alors déposée sur une colonne d'interactions hydrophobes Phényl Superose HR 5/ 5 préalablement équilibrée avec du tampon TG additionné de 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . L'activité est ensuite éluée par un gradient de

15 1M à 0M en sulfate d'ammonium.

**Tableau 1 : Résumé de la purification de la nitrilase**

Fraction	Prot totale (Mg)	Activité totale ( $\mu\text{Mol/ h}$ )	Activité spécifique ( $\mu\text{mole/ h. mg}$ )	Rdt en protéine (%)	Facteur de purification
Cellules entières	955	4300	4,5	100	1
Extrait brut		2400			
Sulfate d'ammo.		650			
QSHL 26/10	3	360	120	0,3	27
MonoQ HR5/5	1,5	240	160	0,15	35
Phényl sépharose	1	120	110	0,1	24

20 **Conditions opératoires:** [nitrile] = 50 mM; tampon phosphate 100 mM pH 7,0; 30°C.

Le poids moléculaire de la protéine est déterminé par gel filtration. Il est d'environ 260 kDa. Sur gel de SDS-PAGE, on observe une unique bande de 43 kDa (pureté de 95%). C'est donc probablement une protéine de structure  $\alpha_6$  avec  $\alpha$  pesant 43 kDa.

**Exemple 2:** Clonage de la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* ATCC8750

La séquence NH<sub>2</sub> terminale présentée dans l'exemple 1 présente une identité totale avec la séquence de l'extrémité N-terminale de la nitrilase d'*A. faecalis* JM3 (Kobayashi *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 247-251), alors que les extrémités N-terminales des nitrilases bactériennes présentent de 35 à 57% d'identité sur 14 résidus. Les inventeurs ont émis l'hypothèse que la nitrilase de l'invention purifiée à partir de la souche ATCC8750 était semblable à celle décrite par Kobayashi *et al.* (précité). La stratégie de clonage a alors consisté à amplifier par réaction de PCR sur l'ADN génomique de la souche ATCC8750 le gène de cette nitrilase, à l'aide de deux sondes nucléotidiques déterminées à partir de la séquence donnée par Kobayashi *et al.* (précité).

Les deux sondes ont été synthétisées, l'une pouvant s'hybrider avec la partie 5' de la séquence donnée par Kobayashi *et al.* (précité) et l'autre avec la partie 3' :

Partie 5' (PCRAF1): CCGGGAATTCATATGCAGACAAGAAAAATCGTCC

Partie 3' (PCRAF2): TCCTTCTGCGTCCCCGATCCCGCAT

L'amorce PCRAF1 comporte 12 nucléotides en 5' permettant d'introduire en amont du codon d'initiation ATG les sites de restriction des enzymes *EcoRI* et *NdeI*. L'amorce PCRAF2 permet d'introduire le site de restriction de l'enzyme *BamHI*. L'ADN génomique de la souche d'*A. faecalis* ATCC8750 a été extrait selon le protocole CTAB décrit par Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons Inc. Ed, 2.4.1-2.4.5) et 100 ng ont été utilisé pour chaque réaction de PCR. Afin de jouer sur la spécificité d'amplification, différentes concentrations en MgCl<sub>2</sub> ont été testées comme indiqué dans Ausubel *et al.* (précité) dans un volume total d'échantillon de 100 µl et avec 2,5 unités de Taq DNA polymérase (Perkin Elmer). Deux réactions supplémentaires ont été réalisées avec 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> et 5% DMSO ou 5% formamide. Un thermocycleur Perkin Elmer 9600 a été programmé avec l'enchaînement suivant: 5 min à 95°C, 30 cycles (30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C, 45 sec à 72°C) et 4 min à 72°C. Les différents produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose 0,8%. Une bande

majoritaire, dont la taille correspond à la taille attendue de 1,15 kb, a été amplifiée dans toutes les réactions mais plus spécifiquement avec 1,5 mM  $MgCl_2$  et 5% DMSO. Les produits de la réaction dans ces conditions ont donc été retenus pour la suite. L'échantillon a été traité à la protéinase K, précipité à l'éthanol après une extraction phénol-chloroforme. Le culot repris en suspension a été incubé pendant 2h à 37°C avec 40 unités d'enzyme *EcoRI* et 40 unités d'enzyme *BamHI*. Après migration sur gel d'agarose 0,7 %, la bande de 1,15 kb a été découpée et extraite pour être clonée dans le vecteur pBSK<sup>-</sup> (Stratagène, La Jolla, USA) ouvert *EcoRI-BamHI* par les méthodes classiques. Cinq clones indépendants, appelés pRPA-BCAT1 à 5, ont été analysés par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique avec les enzymes *NdeI*, *EcoRI*, *BamHI*, *BspMI* et *BglII* (figure 3). Les profils obtenus correspondaient aux profils de restriction théorique d'un plasmide obtenu par cette méthode avec la séquence décrite par Kobayashi *et al.* (précité). La souche XL1Blue (pRPA-BCAT3) a été déposée à la CBS sous le numéro CBS 998-96.

**Exemple 3 :** Séquençage d'un fragment de 1130 pb contenant l'ADN codant pour le polypeptide ayant l'activité nitrilase.

L'insert cloné dans le plasmide pRPA-BCAT3 a été séquencé par la société Genome Express S.A. (Grenoble, France) à partir d'une préparation d'ADN faite au laboratoire (kit Wizzard Midi-prep, Promega). La stratégie de séquençage de ce fragment, réalisé selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier, est indiquée dans la figure 4. Les dix amorces nucléotidiques internes (identifiées par les numéros 623 à 629 et 681 à 682 sur la figure 4) ont été synthétisées d'après la séquence de la nitrilase d'*A. faecalis* JM3 (Kobayashi *et al.*, précité). Cet ensemble a été complété par les amorces universelles "Reverse" et "M13 Forward". Chaque région a été lue au moins une fois sur chaque brin de l'ADN.

La séquence d'ADN obtenue présente deux différences par rapport à la séquence publiée : l'une dans la structure supposée servir de terminateur de transcription et l'autre dans le gène de la nitrilase, appelé *nitB*, conduisant à la substitution Asn<sup>279</sup>→Asp. Ces deux régions ont alors été séquencées

au laboratoire sur les plasmides pRPA-BCAT1, 2, 4, 5 avec deux amorces spécifiques 710 et 682 (cf. figure 4). Le changement C->T à la position 1412 (conformément à la numérotation de Kobayashi, précité) dans le terminateur a été retrouvée dans tous les clones. Il s'agit d'une mutation qui différencie les deux souches d'*A. faecalis*. Le changement A->G à la position 1138 n'est présent que dans le plasmide pRPA-BCAT3. Il s'agit donc d'une mutation introduite lors de la PCR par la Taq DNA Polymerase.

10 **Exemple 4 :** Expression de la nitrilase dans *E. coli* BL21(DE3).

Afin de confirmer l'identification de la séquence d'ADN clonée avec le gène de la nitrilase purifiée, le gène *nitB* a été placé sous le contrôle du promoteur du gène  $\Phi$ 10 phage T7 (PT7) selon le mode opératoire décrit ci-après: les inserts *NdeI-BamHI* de 1,13-kb des plasmides pRPA-BCAT3 et pRPA-BCAT4 ont été clonés dans le vecteur pXL2432 pour donner respectivement les vecteurs pRPA-BCAT12 et pRPA-BCAT 13 décrits sur la figure 5. Le vecteur parent pXL2432 est un hybride entre la région du plasmide pET9 (Studier *et al.*, 1990, Methods In Enzymol. 185, 60-89), comprise entre les sites *AccI* et *EcoRI*, qui englobe l'origine de réplication (ORI) et le marqueur de sélection porteur de la résistance à la kanamycine (Kan), et la région comprise entre les sites *EcoRI* et *AccI* du plasmide pET11a (Novagen Inc., Madison WI, USA) qui englobe la cassette d'expression, le gène du répresseur *lacI* et le gène du régulateur du nombre de copies ROP.

Des cultures ont été menées en condition d'induction selon le mode opératoire ci-après: La souche BL21(DE3) (Novagen Inc., Madison WI, USA) contenant le plasmide pRPA-BCAT12, la souche BL21(DE3) contenant le plasmide pRPA-BCAT13 ainsi que la souche BL21(DE3) contenant le plasmide pXL2432 ont été cultivées 16 h en milieu LB à 37°C (Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics - Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.) contenant 50 µg/ml de kanamycine, puis diluées au 100ème dans le même milieu et à la même température. Lorsque les cultures ont atteint une DO600 comprise entre 0,5 et 1, de l'IPTG, à la concentration finale de 1 mM a été ajouté. Après 6 heures de culture, les

bactéries ont été collectées. Un mode opératoire similaire a été adopté pour cultiver la souche BL21(DE3) contenant les plasmides pRPA-BCAT12 et pXL2231, la souche BL21(DE3) contenant les plasmides pRPA-BCAT13 et pXL2231 ainsi que la souche BL21(DE3) contenant les plasmides pXL2432 et pXL2231 en ajoutant au milieu de culture de la tétracycline à raison de 12 µg/ml de milieu. Le plasmide pXL2231, qui dérive du vecteur pXL1635 (Demande FR 90/05185 du 24/04/1990), appartient au groupe d'incompatibilité IncP et est donc compatible avec les plasmides pRPA-BCAT12 et 13 qui possèdent l'origine de réplication du plasmide ColE1. Son marqueur de sélection est la résistance à la tétracycline et il porte un fragment *EcoRI-HindIII* de 2,2 kb contenant les gènes *GroES* et *GroEL* codant pour des chaperons moléculaires d'*E. coli* (Fayet *et al.*, 1986, Mol. Gen. Genet. 202: 435-445).

L'expression de la nitrilase a été analysée en gel 10 % SDS-PA dans la fraction brute après sonication des cellules, et après centrifugation dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la figure 6 et montrent un niveau élevé d'expression de la nitrilase (NitB) dans les extraits de cellules dont un des plasmides au moins contient l'insert *nitB* ; toutefois, cette protéine est essentiellement sous forme insoluble bien que la présence du plasmide pXL2231 permette d'augmenter la quantité de polypeptide nitrilasique dans la fraction soluble.

Sur la figure 6, M représente le marqueur de poids moléculaires ; ceux-ci sont indiqués en kDa. D'autre part, les pistes ont les significations ci-après :

- A, D, G représentent les fractions brutes respectivement de BL21(DE3) + p/RPA-BCAT12/RPA-BCAT13/XL2432 ;
- B, E, H représentent les surnageants obtenus respectivement à partir de ces mêmes souches ;
- C, F, I représentent les culots obtenus respectivement à partir de ces mêmes souches ;
- J, N, Q représentent les fractions brutes obtenues respectivement à partir de BL21(DE3) + pXL2231 + p/RPA-BCAT12/RPA-BCAT13/XL2432 :



- K, O, R représentent les surnageants obtenus respectivement à partir des ces souches ;

- L, P, S représentent les culots obtenus respectivement à partir de ces souches.

- 5 La souche BL21(DE3) / pRPA-BCAT12 + pXL2231 a été appelée RPA-BIOCAT126. La souche BL21(DE3) / pRPA-BCAT13 + pXL2231 a été appelée RPA-BIOCAT127. Les activités nitrilasiques de cultures de RPA-BIOCAT126, RPA-BIOCAT127, et RPA-BIOCAT66 qui correspond à BL21(DE3) / pXL2432 ont été déterminées comme suit : les cultures ont été
- 10 menées selon le protocole décrit ci-dessus en modifiant le volume de culture (50 ml) et la concentration finale d'IPTG (0,1 mM). Les cultures ont été centrifugées et les culots cellulaires repris dans 10 ml de tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7. L'hydrolyse d'HMTBN est réalisée avec 500 µl de cette suspension ajoutée à 500 µl de solution d'HMTBN 200 mM pH7.
- 15 Une cinétique d'hydrolyse est obtenue en mélangeant 100 µl de ce mélange à 900 µl d'acide phosphorique 0,1 N à intervalles réguliers pendant 1 à 4 heures. Les quantités d'HMTBA produite sont analysées par HPLC comme décrit dans la demande WO 96/09403. Les résultats sont regroupés dans le tableau 2.

20

**Tableau 2 : Activités des souches RPA-BIOCAT66, 126 et 127**

RPA-BIOCAT	MILIEU	INDUCTION	TEMPS DE CULTURE	OD660	ACTIVITE (U)
66	LB Km	0,1 mM IPTG	24 h	2,5	0
126	LB Km Tc	0,1 mM IPTG	24 h	2,4	15
127	LB Km Tc	0,1 mM IPTG	24 h	1,9	10

ABREVIATIONS : Km : Kanamycine 50 µg/ml; Tc : tétracycline 12 µg/ml;

25 h : heures; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec.

Afin d'améliorer la solubilisation du polypeptide nitrilasique exprimé, le plasmide pRPA-BCAT37 a été construit comme ci après. Le plasmide pXL2391 a été obtenu en ligaturant le fragment de 5,9 kb *EcoRI-PvuII* du plasmide pDSK519 (Keen *et al.*, 1988, Gene 70: 191-197), traité avec la polymérase Klenow, avec le fragment *HindIII* de 2056 bp extrait du plasmide pHP45 $\Omega$ Sp (Prentki et Krisch, 1984, Gene 29: 303-313) traité à la Nucléase Mung Bean. Le plasmide pXL2391 a ensuite été digéré par *SmaI* et *SacI* et l'insert de 2,3 kb portant l'opéron GroESL, extrait du plasmide pXL2231 digéré par *HindIII*, traité à la Klenow et digéré par *SacI*, y a été introduit. Le plasmide pRPA-BCAT37 est donc un dérivé du plasmide RSF1010 à plus fort nombre de copies que le plasmide pXL2231, compatible avec les plasmides porteurs de l'origine ColE1 et portant un marqueur de résistance à la streptomycine. Ce plasmide a été introduit dans la souche BL21(DE3) / pRPA-BCAT12 pour donner la souche RPA-BIOCAT171. L'activité d'une culture menée selon un mode opératoire similaire à celui décrit ci-dessus, mais en remplaçant la tétracycline par la streptomycine à 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a été déterminée et est rapportée dans le tableau 3.

20

**Tableau 3 : Activité de la souche RPA-BIOCAT171**

RPA-BIOCAT	MILIEU	INDUCTION	TEMPS DE CULTURE	OD660	ACTIVITE (U)
171	LB Km Sm	0,1 mM IPTG	24 h	3,2	14

ABREVIATIONS : Km : Kanamycine 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sm : Streptomycine 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; h : heures; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec.

25

**Exemple 5: Expression de la nitrilase dans *E. coli* DH5alpha.**

Le plasmide pRPA-BCAT6 a été construit en clonant sur pBCAT3 (cf. figure 3) le fragment de 0,6 kb *Scal*-*Nde*I de pXL2158 contenant le promoteur *P<sub>trp</sub>* et le site de fixation du ribosome RBS*cll* (Levy-Schill *et al.*, 1995, Gene 161: 15-20). L'expression a été réalisée avec la souche DH5alpha contenant le plasmide pRPA-BCAT6 et/ou le plasmide pXL2035 (Levy-Schill *et al.*, précité) avec le mode opératoire suivant : la préculture est incubée 16h à 37°C en milieu M9 glucose (Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) contenant 0,4% de casaminoacides, 100 µg/ml de tryptophane, 100 µg/ml de carbenicilline. Pour les souches contenant pXL2035, de la kanamycine est ajoutée à raison de 50 mg/l. L'expression se fait après dilution au 1/100 de la culture saturée dans un milieu identique mais sans tryptophane et incubation 8 à 16 h à 37°C.

L'analyse en SDS-PAGE des extraits des différentes souches est réalisé comme décrit dans l'exemple précédent et est présentée sur la figure 7.

Sur cette figure, M représente le marqueur de poids moléculaires ; ceux-ci sont indiqués en kDa. D'autre part, les pistes ont les significations ci-après :

- L, I, F, C représentent les fractions brutes obtenues respectivement à partir des souches DH5alpha + pRPA-BCAT/3, /6, /6 + pXL2035, RPA-BIOCAT76 ;
- K, H, E, B représentent les surnageants obtenus respectivement à partir de ces mêmes souches ;
- J, G, D, A représentent les culots obtenus respectivement à partir de ces mêmes souches.

Le plasmide pRPA-BCAT6 permet d'obtenir une faible accumulation d'un polypeptide à 43 kDa, majoritairement insoluble. La coexpression de GroE à partir du plasmide pXL2035 réduit la surexpression, mais après trois repiquages successifs de la souche DH5alpha (pRPA-BCAT6 + pXL2035), la souche RPA-BIOCAT76 sélectionnée retrouve un niveau initial d'expression du polypeptide nitrilasique, celui-ci étant quasi complètement soluble. Les

dosages d'activités des cultures réalisés selon les modes opératoire décrits ci-dessus et dans l'exemple précédent sont présentés dans le tableau 4.

5 **Tableau 4:** Activité des souches *DH5alpha* (pRPA-BCAT3), *DH5alpha* (pRPA-BCAT6), *DH5alpha* (pRPA-BCAT6 + pXL2035), RPA-BIOCAT76

SOUCHE	MILIEU	TEMPS DE CULTURE	OD660	ACTIVITE (U)
DH5alpha (pRPA-BCAT3)	M9 Cb	24 h	4	0
DH5alpha (pRPA-BCAT6)	M9 Cb	24 h	4	0,6
DH5alpha (pRPA-BCAT6 + pXL 2035)	M9 Cb Km	24 h	3	1,6
RPA-BIOCAT76	M9 Cb Km	24 h	3,8	5

ABREVIATIONS : Km : Kanamycine 50 µg/ml; Cb : Carbenicilline 100 µg/ml; h : heures; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec.

Ces données montrent que la coexpression de GroE permet d'améliorer l'expression de la nitrilase et qu'une sélection de souche classique par repiquages successifs contribue aussi à l'amélioration de l'activité des recombinants.

**Exemple 6 :** Expression de la nitrilase dans *Pseudomonas putida* et *Alcaligenes faecalis*.

Le système d'expression décrit dans l'exemple 5 a été utilisé pour produire la nitrilase chez *Pseudomonas putida* et *A. faecalis*. Le fragment de 1,14 kb *NdeI-XbaI* de pRPA-BCAT6 contenant le gène *nitB* a été introduit dans les sites *NdeI-XbaI* du vecteur pXL1289. Le vecteur pXL1289 est un dérivé de pKT230 (Bagdasarian *et al.*, 1981, Gene 15: 237-247) portant l'origine de réplication (*oriV*) multi-hôte chez les bactéries Gram-négatives et

qui contient un fragment *EcoRI-NdeI* de 120 bp porteur du promoteur *P<sub>trp</sub>* et du *RBSclI* de pXL534 (Latta *et al.*, 1990, DNA and Cell Biology, 9: 129-137), un insert *NdeI-XbaI* codant pour le gène *cobA* (Crouzet *et al.*, 1990, J. Bacteriol. 172: 5968-5979) et un insert *XbaI-BamHI* de 500 bp contenant le  
5 terminateur *T<sub>rrnB</sub>* de pXL534 (Latta *et al.*, 1990, DNA and Cell Biology, 9: 129-137). Le plasmide obtenu pRPA-BCAT14 est donc un dérivé de pKT230 contenant un gène conférant la résistance à la kanamycine (Kan) et le gène *nitB* sous le contrôle de *P<sub>trp</sub>:RBSclI* (figure 8).

Lors de l'introduction de ce plasmide dans la souche d'*E. coli*  
10 DH5alpha, un clone particulier a été sélectionné : il exprimait une nitrilase dont le poids moléculaire sur gel SDS-PA est de 44 kDa au lieu de 43 kDa. Le plasmide hébergé par ce clone présente le même profil de restriction que pRPA-BCAT14 et a été appelé pRPA-BCAT24. Enfin, le plasmide pRPA-BCAT23 a été construit selon le même mode opératoire que pRPA-BCAT14  
15 avec la modification suivante : le fragment de 136 bp *StuI-BsmI* de pRPA-BCAT6 a été remplacé par le fragment *StuI-BsmI* de pRPA-BCAT4. Le plasmide pRPA-BCAT23 exprime donc une nitrilase NitB avec un résidu Asn à la position 279.

Les plasmides pRPA-BCAT14, 23 et 24 ont été introduits par  
20 électroporation dans la souche *Pseudomonas putida* G2081. La souche G2081 dérive de la souche KT2440 (Bagdasarian and Timmis, 1981, in Hofschneid and Goebel, Topics in Microbiology and Immunology, 47, Springer Verlag, Berlin) par sélection de la résistance spontanée à l'acide nalidixique et à la rifampycine. Le vecteur pKT230 a été utilisé comme  
25 plasmide contrôle.

Les plasmides pRPA-BCAT14, pRPA-BCAT23, pRPA-BCAT24 et pKT230 ont alors été extraits des souches de *P. putida* pour être introduits par électroporation dans la souche d'*A. faecalis* ATCC8750 (= RPA-BIOCAT1).

30 Les souches G2081 (pRPA-BCAT14), G2081 (pRPA-BCAT23), G2081 (pRPA-BCAT24), G2081 (pKT230) et RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT14), RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT23), RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT24), RPA-BIOCAT1 (pKT230) ont été cultivées la nuit à 30°C dans du milieu LB contenant 50 mg/l de kanamycine. Ces précultures ont été diluées au 1/100 dans du milieu  
35 M9 contenant 50 mg/l de kanamycine et incubées 20 h à 30°C.

Après sonication des cellules, l'expression de la nitrilase a été mesurée sur un gel 10% SDS-PA dans la fraction brute après sonication des cellules, et après centrifugation dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la figure 9. Pour les souches RPA-BIOCAT1 (pKT230) et G2081 (pKT230), seuls les extraits bruts ont été déposés (pistes A et I respectivement). Sur cette figure, M représente le marqueur de poids moléculaires; ceux-ci sont indiqués en kDa. D'autre part, les pistes ont les significations ci-après :

- B, D, F représentent les fractions brutes obtenues respectivement à partir des souches RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT14), RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT23), RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT24) ;
- C, E, G représentent les surnageants obtenus respectivement à partir de ces mêmes souches ;
- H représente le culot obtenu à partir de RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT24) ;
- J, L, O représentent les fractions brutes obtenues respectivement à partir des souches G2081 (pRPA-BCAT14), G2081 (pRPA-BCAT23), G2081 (pRPA-BCAT24) ;
- K, N, P représentent les surnageants obtenus respectivement à partir de ces mêmes souches ;
- Q représente le culot obtenu à partir de G2081 (pRPA-BCAT24).

Cette expérience montre que les souches de *P. putida* expriment des quantités importantes des trois polypeptides nitrilasiques solubles et que seul le polypeptide nitrilasique à 44 kDa est surexprimé par la souche d'*A. faecalis*. Les dosages d'activité de ces cultures, réalisés selon le protocole décrit dans l'exemple 4, montrent que les souches G2081 (pRPA-BCAT23), G2081 (pRPA-BCAT24), et RPA-BIOCAT1 (pRPA-BCAT24) ont une activité nitrilasique sur l'HMTBN.

#### **Exemple 7 : Expression de la nitrilase dans *Corynebacterium glutamicum*.**

L'expression de la nitrilase a été réalisée dans la souche CGL1010 (= ATCC 14752) à l'aide du promoteur *PcspB* (Peyret *et al.*, 1993, Molecular Microbiol. 9: 97-109). Un fragment de 530 bp contenant le promoteur *PcspB*

a été amplifié à partir du plasmide pCGL815 (Peyret *et al.*, précité) à l'aide des amorces KS1 et KS2 suivante:

KS1: 5'-ACGCGTCGACCAGATCGTCAAGTTGTGG-3'

5 KS2: 5'-CATAGAGGCGAAGGCTCCTTG-3'

Après digestion par *Sal* I, le fragment de 530 bp amplifié a été cloné dans le plasmide pBSK (Statagene, La Jolla USA) ouvert par *Sal* I et *Eco*RV pour donner le plasmide pCGL1084. Un adaptateur *Eco*NI/*Nde*I a été  
10 fabriqué en hybridant les deux oligonucléotides KS8 et KS9 suivants :

KS8: 5'-TCAAGGAGCCTTCGCCTCA-3'

KS9: 5'-TATGAGGCGAAGGCTCCTTG-3'

15 Le gène de la nitrilase a été extrait du plasmide pRPA-BCAT6 sous la forme d'un fragment *Nde*I-*Xba*I de 1,1 kb. Il a été introduit dans pCGL1084 ouvert avec *Eco*NI et *Xba*I en utilisant l'adaptateur *Eco*NI/*Nde*I décrit ci-dessus pour donner le plasmide pCGL1086. Le fragment *Sal* I-*Bam*HI de pCGL1086 contenant *PcspB::nitB* a ensuite été cloné dans le vecteur  
20 pCGL482 (Peyret *et al.*, précité) aux sites *Sal* I et *Bam*HI conduisant au plasmide pCGL1087. Le plasmide pCGL1087 (figure 10) est donc un vecteur navette à base de pBI1 (Santamaria *et al.*, 1984, J. Gen. Microbiol. 130: 2237-2246) contenant l'origine de réplication de pACYC 184 reconnue chez *E. coli*, un gène conférant la résistance au chloramphénicol (Cm) et la fusion  
25 *PcspB::nitB*.

Les plasmides pCGL1087 et pCGL 482 ont été introduits par électroporation dans CGL1010 comme décrit par Bonnamy *et al.*, 1990 (FEMS Microbiol. Lett. 66: 263-270). Après 20 heures de culture à 30°C en  
30 milieu Brain Heart Infusion 3,7% (Difco Laboratories, Detroit, USA) additionné de chloramphénicol 5 mg/l, des dosages d'activités nitrilase ont été réalisés sur des échantillons de culture comme décrit dans l'exemple 4. Les résultats montrent que la souche CGL1010 (pCGL1087) possède une activité nitrilase alors que la souche CGL1010 (pCGL482) n'en a pas.

35

**Exemple 8 :** Expression de la nitrilase dans *Streptomyces lividans*.

L'expression de la nitrilase a été réalisée dans la souche de *S. lividans* TK24 (Hopwood *et al.*, 1985, Genetic Manipulation of Streptomyces; A  
5 laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich) à l'aide du plasmide pIJ6021 (Takano *et al.*, 1995, Gene 166: 133-137) en utilisant le promoteur *PtipA* (Holmes *et al.*, 1993, EMBO J. 12: 3183-3191).

Le plasmide pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985, Gene 33: 103-119) a  
été modifié en délétant le fragment *Tfi I* de 140 bp par digestion *Tfi I*,  
10 traitement à la Klenow et ligature du vecteur sur lui-même. Le plasmide  
obtenu a été ouvert avec *EcoRI* et *BamHI* afin de cloner le fragment de 1,15  
kb *EcoRI-BamHI* de pRPA-BCAT3 contenant le gène *nitB*. Le plasmide  
pOS48.4 ainsi obtenu possède un site unique *Tfi I* situé entre le gène *nitB* et  
le site *BamHI*. Ce site a été utilisé pour insérer un fragment  $\Omega$ hyg de 2,3 kb  
15 extrait du plasmide pHP45 $\Omega$ hyg (Blondelet-Rouault *et al.*, Gene, submitted)  
après digestion par *BamHI* et traitement à la Klenow. Le fragment  $\Omega$ hyg  
contient le gène de l'hygromycine phosphotransferase (*hyg*) de *Streptomyces*  
*hygroscopicus* (Zalacain *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res., 14: 1565-1581) et  
confère à *S. lividans* une résistance à l'hygromycine. Le plasmide pOS48.5  
20 ainsi obtenu a été utilisé pour isoler un fragment *NdeI-BamHI* de 3,45 kb  
contenant le gène de la nitrilase suivi du gène *hyg*, qui a été cloné dans le  
plasmide pIJ6021 (Takano *et al.*, précité) ouvert par *NdeI* et *BamHI*. Le  
plasmide pIJ6021 ne se répliquant que dans *Streptomyces*, le mélange de  
ligation a été transformé dans *S. lividans* TK24 par des méthodes classiques  
25 (Hopwood *et al.*, précité) en sélectionnant les clones résistant à 200 mg/l  
d'hygromycine (Boehringer Mannheim). Les ADN plasmidiques de ces clones  
ont été extraits par des méthodes classiques (Hopwood *et al.*, précité) et  
leurs profils de restriction correspondaient bien à la construction attendue qui  
a été appelée pOS48.7 (figure 11).

30

Deux clones de *S. lividans* contenant pOS48.7 ainsi qu'un clone  
contenant le plasmide pIJ6021 ont été cultivés dans 50 ml de milieu TSB  
(Tryptic Soy Broth, Difco) à 30 °C pendant 72 h avec une sélection  
kanamycine 5 mg/l, puis du thiostrépton a été ajouté à la concentration de 5  
35 mg/l et la culture a été poursuivie pendant encore 18 h selon les conditions



décrites (Hopwood *et al.*, précité). La culture a été récoltée et le dosage d'activité, réalisé dans les conditions décrites dans l'exemple 4, montre que la souche *S. lividans* TK24 (pOS48.7) exprime une activité nitrilase contrairement à la souche TK24 (pIJ6021).

5

**Exemple 9 : Hydrolyse de l'HMTBN avec d'autres nitrilases**

La séquence primaire de la nitrilase de *Comamonas testosteroni* sp., décrite dans Levy-Schil *et al.*, 1995 (précité) présente 31 % d'identité avec la séquence primaire de la nitrilase décrite dans cette invention. La souche recombinante d'*E. coli* TG1 (pXL2158, pXL2035), qui exprime la nitrilase de *C. testosteroni*, a été cultivée dans les conditions décrites par Lévy-Schil *et al.* (précité) et un culot cellulaire a été incubé dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7 avec 50 mM HMTBN, à 30°C. L'activité mesurée était de 2,3 kg/h.kg CS. Comme la nitrilase de l'invention, la nitrilase de *C. testosteroni* est capable d'hydrolyser l'HMTBN.

De plus, les données présentées dans l'exemple 4 avec les plasmides pBCAT12 et pBCAT13 montrent que la substitution Asn279 -> Asp 279 sur la nitrilase d'*A. faecalis* ATCC8750 permet de conserver l'activité sur HMTBN.

**Exemple 10 : Apport du support**

5 g de cellules sèches ont été ajoutés à 20 g d'eau ajustée à pH 7,0. La quantité de support (CELITE 545, Prolabo, France) indiquée est ensuite ajoutée et après une parfaite homogénéisation, la suspension est réticulée par ajout de 15 % de glutaraldéhyde basé sur la masse sèche totale suivi de 10 % de polyéthylèneimine (SEDIPUR, BASF, Allemagne). La suspension est agitée 1 heure à température ambiante.

La suspension est ensuite floculée par ajout de 0,001% d'un flocculant anionique, Superfloc A100. La masse réticulée est récupérée par filtration.

Cette masse est ensuite de nouveau réticulée par ajout de 10% de polyazétidine (KYMENE 557, Hercules, USA) basé sur la masse sèche totale. La masse encore humide est ensuite extrudée à travers un orifice de 0,5 mm de diamètre et séchée.

- 5 L'activité des particules obtenues est ensuite déterminée suivant une procédure décrite dans le brevet WO 96/09403.

g de support	Activité (en %/)
0	100
2,5 g	215
5 g	250

L'ajout de support pour les cellules améliore notablement l'activité.

- 10 L'expérience a été répétée en substituant la CELITE par du gluten de blé (Roquette, France) partiellement soluble dans l'eau ou de la gélatine (SBI, France) totalement soluble dans l'eau..

Support	% activité
0	100
5 g de gluten	160
5 g de gélatine	nd*

\* La suspension cellulaire ne floccule pas et n'est pas filtrable.

- 15 Cet exemple montre que le gluten peut être substitué à la CELITE. En revanche, si l'ajout est de la gélatine (totalement soluble), la mise en forme du catalyseur est impossible par la technique décrite précédemment (extrusion).

### Exemple 11

- 20 10 g de *Escherichia coli* BIOCAT171 de l'exemple 4 préparés par culture aérobie dans un milieu LB ont été mélangés à 10 g de CLARCEL 78 (CECA, France) dans 500 g de tampon phosphate 100 mM pH 7,0. Après

- homogénéisation, 6 g de glutaraldéhyde 25% ont été ajoutés et la suspension a été agitée 15 minutes à température ambiante. 2 g de polyéthylènimine ont été ensuite ajoutés ainsi que 6 g de glutaraldéhyde à 25%. Le tout a été agité durant une heure à température ambiante.
- 5 L'ensemble a été floculé par l'ajout de 5 ml d'une solution de SUPERFLOC A100 à 0,2 % (CYTEC, France). La masse a été filtrée et la pâte obtenue a été mélangée avec 16 g de polyazétidine à 12,5% (KYMENE 557, Hercules) puis extrudée à travers un orifice de 0,5 mm de diamètre. Les vermicelles obtenus ont été séchés à 35°C dans une étuve puis plongés 30 minutes dans
- 10 un bain de  $\text{NaBH}_4$  à 1% préparé dans un tampon borate 50 mM pH 10,0. Le biocatalyseur est ensuite lavé à l'eau distillée. Le catalyseur est conservé à 5°C ou à température ambiante dans un tampon phosphate 500 mM pH 8,0.

- Une colonne thermostatée de 3 cm de diamètre intérieur et de 45 cm de haut a été remplie avec 100 g de biocatalyseur. Cette colonne est reliée à
- 15 une pompe via une boucle de recirculation. Le volume total du réacteur est de 430 ml. La boucle est remplie d'une solution de sel d'ammonium de l'acide hydroxy méthylthio butyrique à 25%. La solution est alimentée par le haut de la colonne vers le bas à un débit horaire de 20 l/ h. L'eau qui circule dans la double enveloppe de la colonne et dans l'échangeur thermique permet de
- 20 maintenir la température à 35°C. L'eau déminéralisée est ajoutée à la boucle à un débit de 80 g/h. Le 2-hydroxy 4-méthylthiobutyronitrile est ajouté à 20 g/ h. L'excédent de volume du milieu de réaction est évacué par le bas de la colonne de telle manière que le volume de la boucle reste constant. Ainsi, on obtient un flux continu avec un taux de transformation du nitrile de 95 %. De
- 25 plus la concentration de la solution aqueuse de sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique obtenue en sortie du réacteur est de 25%.

### Exemple 12

- L'électrodialyseur utilisé est constitué d'un empilement de 9 cellules de 2 dm<sup>2</sup> de surface active, composées chacune d'elles de 2 compartiments
- 30 désignés comme suit :

- compartiment sel/acide : limité du côté cathode par une membrane échangeuse de cations Neosepta CMB de Tokuyama Soda, et du côté anode par la face cationique d'une membrane bipolaire Aqualytics

5       - compartiment base : limité du côté anode par la membrane cationique, et du côté cathode par la face anionique de la membrane bipolaire.

L'anode est constituée de titane platiné. La cathode est en acier inoxydable.

10       L'électrolyte est constitué par une solution aqueuse de sulfate de sodium ayant une conductivité de 100 mS/cm à 40°C. Le débit de circulation aux électrodes est de 2x100 l/h. Le volume est de 5 l.

Le compartiment "base" est initialement rempli de 5 litres d'une solution de sulfate d'ammonium à 1 %.

15       Le compartiment "sel/acide" est initialement rempli de 5 litres d'une solution à 1,44 mole/l du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque.

Le débit de recirculation des solutions est initialement fixé à 130 l/h pour le compartiment sel/acide et à 190 l/h pour le compartiment base.

20       L'électrodialyse est effectuée en mode discontinu (fonctionnement en recirculation), à une température moyenne de 40°C. L'intensité est imposée à 9 A, soit une densité de courant de 0,45 kA/m<sup>2</sup>.

Après 155 minutes de fonctionnement, la conductivité du compartiment sel/acide est passée de 59 à 7,8 mS/cm.

25       Le compartiment sel/acide contient 1,35 mole/l d'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque, à 100% sous forme acide.

Le rendement faradique est estimé à 71% et la consommation énergétique à 0,53 kWh par kg d'acide formé.

**Exemple 13**

L'électrodialyseur utilisé est constitué d'un empilement de 8 cellules de configuration identique à celle de l'exemple 12.

5 Le compartiment "base" est initialement rempli de 5,27 litres d'une solution de sulfate d'ammonium à 1%.

Le compartiment "sel/acide" est initialement rempli de 4,85 litres d'une solution à 1,39 mole/l du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque.

10 Le débit de recirculation des solutions est initialement fixé à 60 l/h pour le compartiment sel/acide et à 150 l/h pour le compartiment base.

L'électrodialyse est effectuée en mode discontinu (fonctionnement en recirculation), à une température moyenne de 40°C. L'intensité est imposée à 9 A, soit une densité de courant de 0,45 kA/m<sup>2</sup>.

15 Après 172 minutes de fonctionnement, la conductivité du compartiment sel/acide est passée de 59 à 9,5 mS/cm.

Le volume final du compartiment sel/acide est de 4,67 litres.

La composition est la suivante:

acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque:	1,24 mole/l
2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoate d'ammonium:	0,148
20 mole/l	

Le taux de transformation est de 86 %. Le produit final est à 89 % sous forme acide.

Le rendement faradique est de 74%. La consommation énergétique est estimée à 0,58 kWh par kg d'acide formé.

**Exemple 14**

On utilise un dispositif analogue à celui de l'exemple 13.

Le compartiment "base" est initialement rempli de 5,46 litres d'une solution de sulfate d'ammonium à 1%.

- 5 Le compartiment "sel/acide" est initialement rempli de 5,23 litres d'une solution à 1,24 mole/l du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque.

Le débit de recirculation des solutions est initialement fixé à 90 l/h pour le compartiment sel/acide et à 150 l/h pour le compartiment base.

- 10 L'électrodialyse est effectuée en mode discontinu (fonctionnement en recirculation), à une température moyenne de 40°C. L'intensité est imposée à 14 A, soit une densité de courant de 0,7 kA/m<sup>2</sup>.

Après 105 minutes de fonctionnement, la conductivité du compartiment sel/acide est passée de 57,6 à 9,8 mS/cm.

- 15 La composition finale du compartiment sel/acide est la suivante:
- |   |             |
|---|-------------|
| acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque:     | 1,28 mole/l |
| 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoate d'ammonium: | 0,14 mole/l |

Le produit est donc à 90% sous forme acide.

**Exemple 15**

- 20 On utilise un dispositif analogue à celui de l'exemple 13.

L'essai est mis en oeuvre avec le contenu du compartiment base obtenu à l'issue de l'exemple 14.

- 25 Le compartiment "sel/acide" est initialement rempli de 5,2 litres d'une solution à 1,44 mole/l du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque.

Le débit de recirculation des solutions est initialement fixé à 50 l/h pour le compartiment sel/acide et à 150 l/h pour le compartiment base.

L'électrodialyse est effectuée en mode discontinu (fonctionnement en recirculation), à une température moyenne de 42°C. L'intensité est imposée à 19 A, soit une densité de courant de 0,95 kA/m<sup>2</sup>.

Après 53 minutes de fonctionnement, la conductivité du compartiment sel/acide est passée de 59 à 27 mS/cm.

Le volume final du compartiment sel/acide est de 4,85 litres.

La composition est la suivante:

acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoïque:	0,87 mole/l
2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoate d'ammonium:	0,56 mole/l

Le taux de transformation est de 56%. Le produit final est à 61% sous forme acide.

Le rendement faradique est de 83%. La consommation énergétique est estimée à 0,7 kWh par kg d'acide formé.

### Exemple 16

On concentre en batch 200,1 g de solution d'HMTBS à environ 1,5 M dans un évaporateur rotatif. La température du bain est de 45+/- 5 °C. La pression est réglée aux alentours de 2,5.10<sup>3</sup> Pa (25 mbar). La température dans le bouilleur évolue de 25°C en début de distillation jusqu'à 40°C en fin. Au bout de 3 heures, on récupère 41,9 g d'un milieu visqueux jaune dont les caractéristiques sont les suivantes :

25

viscosité à 25°C (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	1150
% HMTBA (Br- /BrO <sub>3</sub> -)	83,3

Après ajustement du titre (dilution à H<sub>2</sub>O), on obtient un produit dont les caractéristiques sont les suivantes :

viscosité à 25°C (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	396
% HMTBA (Br- /BrO <sub>3</sub> -)	79,5

5 Par potentiométrie on a la répartition massique suivante :

% HMTBS	81,6
% HMTBA	6,0

En CLHP, on mesure le rapport des surfaces monomère ou dimères/(monomère+dimères)

10

monomère/(monomère+dimères)	100
dimères/(monomère+dimères) (*)	0

(\*) on ne détecte pas de dimères

15

### Exemple 17

20 On concentre en batch 200.0 g de solution d'HMTBS à environ 1,5 M dans un évaporateur rotatif. La température du bain est de 121+/- 5 °C. La pression est réglée aux alentours de 9,5.10<sup>4</sup> Pa. La température dans le bouilleur évolue de 100°C en début de distillation jusqu'à 113°C en fin. Au bout de 3 heures, on récupère 41,5 g d'un milieu visqueux brun dont les caractéristiques sont les suivantes :



viscosité à 25°C (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	-
% HMTBA (Br- /BrO <sub>3</sub> -)	90,7

Après ajustement du titre (dilution à H<sub>2</sub>O), on obtient un produit dont les caractéristiques sont les suivantes :

5

viscosité à 25°C (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	117
% HMTBA (Br- /BrO <sub>3</sub> -)	78,8

Par potentiométrie, on a la répartition massique suivante :

% HMTBS	52,2
% HMTBA	28,7

10 En CLHP, on mesure le rapport des surfaces monomère ou dimères/(dimères+monomère)

monomère/(monomère+dimères)	95,0
dimères/(monomère+dimères)	5,0

15

### Exemple 18

20 A 100,0 g du milieu décrit dans l'exemple n°17, on rajoute 40,0 g de H<sub>2</sub>O . On extrait le milieu par 75,0 g d'éther isopropylique. Après séparation des phases, on récupère dans la phase organique après évaporation, 25,6 g d'HMTBA dont les caractéristiques sont les suivantes :

détermination	
monomère/(monomère+dimères) (% surface)	97,0
dimères/(monomère+dimères) (% surface)	3,0
viscosité à 25 °C (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	55

**Exemple 19** : Vieillessement des solutions décrites dans les exemples précédents

5

	exemple n°16	exemple n°17	exemple n°18
Durée de stockage à 25°C	40 j	40 j	100 j
viscosité (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	387	116	66
monomère/(monomère+dimère)	100,0	95,0	82
dimères/(monomère+dimères)	0,0	5,0	18

Les solutions des exemples 16 et 17 n'ont pas évolué dans leur tenue en dimères après 40 jours de stockage.

10

### REVENDICATIONS

1 - Procédé de préparation de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique et/ou du sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique par hydrolyse enzymatique du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile caractérisé en ce que :

- a) dans une première étape on prépare un matériel biologique ayant une activité nitrilase,
- b) dans une deuxième étape, on l'immobilise,
- c) dans une troisième étape, on met en présence le 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile avec le matériel biologique ainsi immobilisé, pour obtenir le sel d'ammonium de l'acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique,
- d) dans une quatrième étape, éventuellement, on convertit le sel obtenu à l'étape c) en l'acide correspondant, et
- e) dans une cinquième étape, on concentre le produit obtenu à l'étape c) ou d).

2. - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'activité nitrilase est obtenue à partir d'une nitrilase d'*Alcaligenes*, de préférence *faecalis*.

3. - Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'on utilise l'information génétique codant pour une nitrilase que l'on exprime dans un microorganisme hôte.

4. - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le microorganisme hôte est choisi parmi *Escherichia coli* ou un membre du genre *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Penicillium* et *Aspergillus*.

5. - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'activité nitrilase est obtenue à partir de la nitrilase codée par le gène cloné dans le plasmide pRPA-BCAT3, déposé à la CBS sous le numéro CBS 998-96.

6. - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la nitrilase est co-exprimée avec une protéine chaperonne.

7. - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la protéine chaperonne est GroESL dans *E. coli*.

5        8. - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le matériel biologique de l'étape a) est immobilisé sur un support solide.

10       9. - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le support solide a une granulométrie comprise entre 1  $\mu$ m et 3 mm, de préférence 10  $\mu$ m et 2 mm, et en ce qu'il est ajouté à raison de 0,01 à 500 %, de préférence 10 à 200 % en poids du matériel biologique.

10. - Procédé selon la revendication 9, en ce que le support solide est choisi parmi :

- 15        - les résines échangeuses d'ions,  
          - l'alumine.  
          - les silice de synthèse ou diatomées et les gels de silice,  
          - les zéolites,  
          - les charbons,  
20        - les protéines partiellement solubles dans l'eau, et  
          - les polysaccharides.

11. - Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le support solide est le gluten.

25        12. - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'on utilise un ou plusieurs agents chimiques pour réticuler et/ ou insolubiliser le matériel biologique et le support.

30        13. - Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les agents chimiques sont choisis parmi :

- les polymères de polyazétidine,
- les polymères de polyéthylèneimine,
- les polymères de polyamides,
- les polymères d'isocyanates,
- 5    – les gels d'alginate,
- les gels de k-carraghénane,
- les amines,
- les aldéhydes,
- les acides carboxyliques, et
- 10    – les isocyanates.

14. - Procédé selon les revendications 10 à 13, caractérisé en ce que le matériel biologique et le support sont mélangés en présence d'agents chimiques pour obtenir une pâte qui est extrudée puis séchée.

15

15. - Procédé selon les revendications 10 à 13, caractérisé en ce que le matériel biologique et les agents chimiques sont mélangés puis déposés sur le support sous forme d'une couche mince.

20

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on obtient un mélange d'HMTBS et d'HMTBA contenant au moins 60% d'HMTBA, et de préférence au moins 80% d'HMTBA, le complément étant de l'HMTBS, par dissociation électrolytique du sel d'ammonium correspondant.

25

17. - Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la dissociation est réalisée dans un électrolyseur à membranes bipolaires à trois compartiments.

18. - Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la dissociation est réalisée dans un électrolyseur à membranes bipolaires à deux compartiments.

30

19. - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'un mélange d'HMTBS et d'HMTBA est obtenu par chauffage d'une solution de sel d'ammonium.

20. - Procédé selon les revendications 16 à 19, caractérisé en ce que l'ammoniaque libérée est distillée, concentrée et recyclée dans la synthèse d'HCN.

5

21. - Solution aqueuse obtenue selon les revendications 16 à 19 constituée d'un mélange d'HMTBA et d'HMTBS dont le rapport pondéral HMTBA/ (HMTBA+HMTBS) est de 5 à 99,9% et de préférence de 10 à 50%.

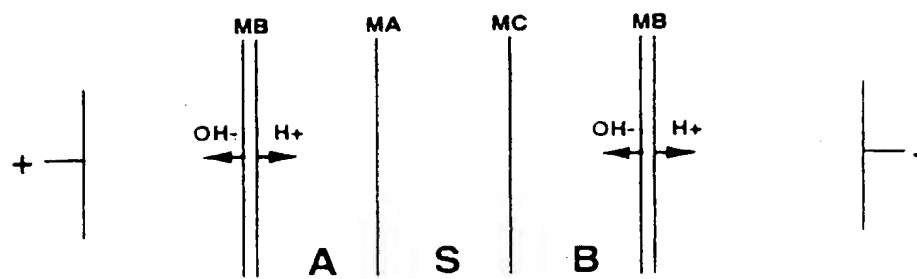
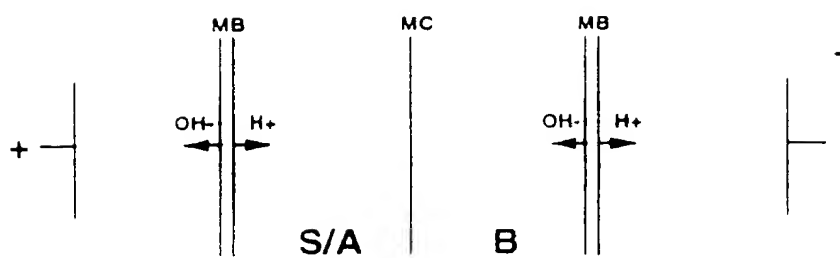
10 22. - Installation pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, comprenant :

- un ou plusieurs réacteurs (3,4) garni avec des enzymes immobilisées ayant une activité nitrilase, ou des microorganismes hôtes immobilisés, exprimant une enzyme à activité nitrilase,

- éventuellement, un ou plusieurs moyens d'électrodialyse (9),

15 - des moyens de concentration (6,12) du produit final.

23. - Plasmide pRPA-BCAT3, déposé à la CBS sous le numéro CBS 998-96.

FIG. 1AFIG. 1B

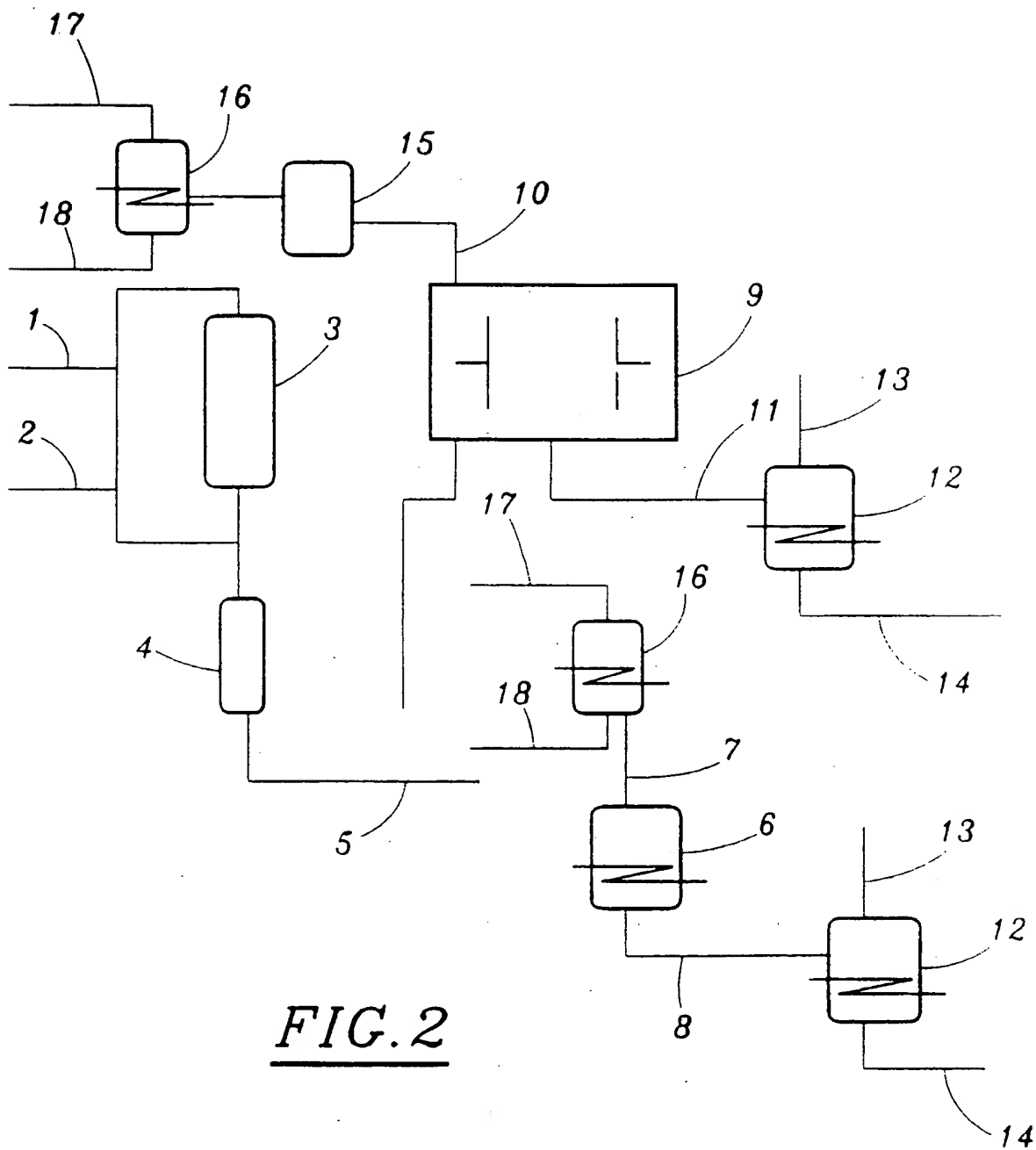
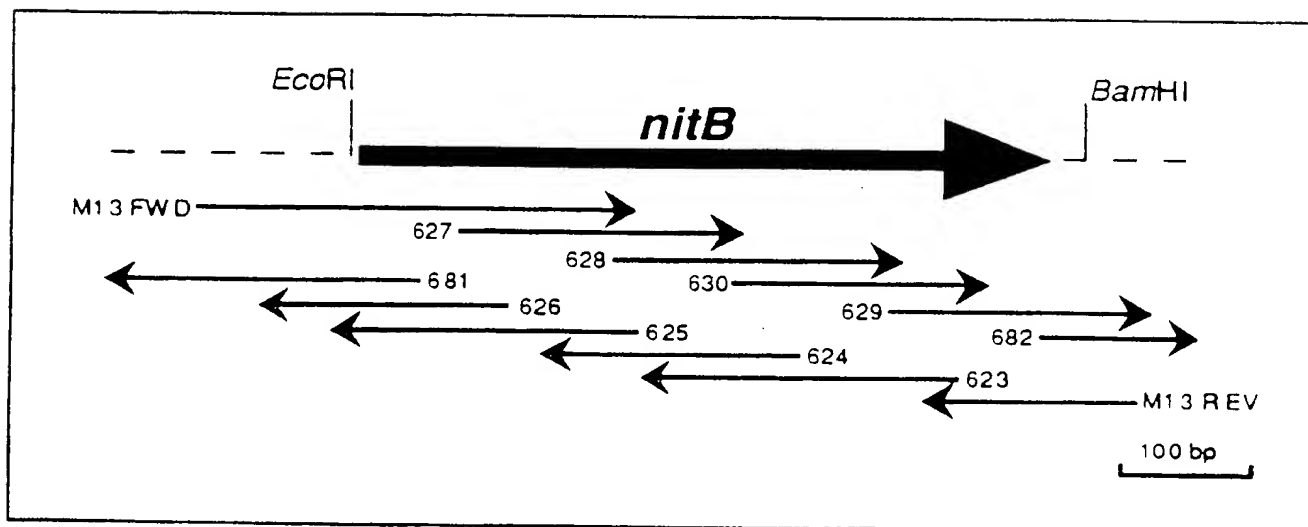
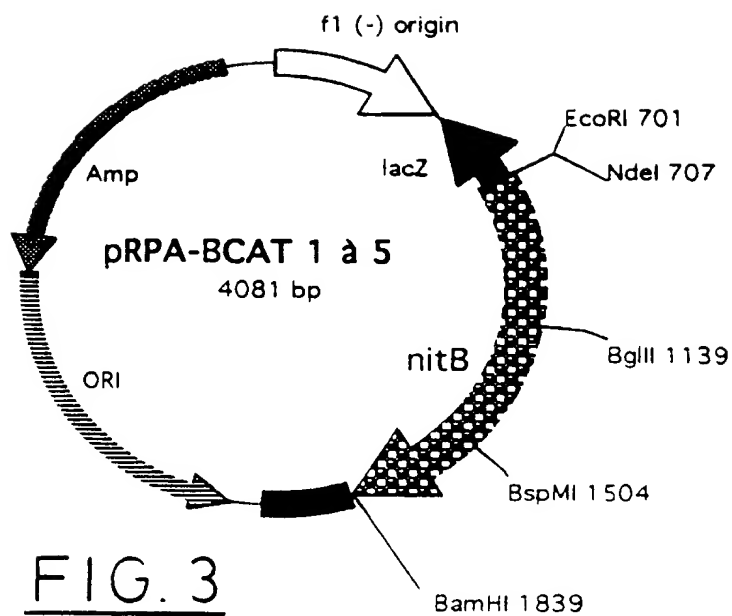
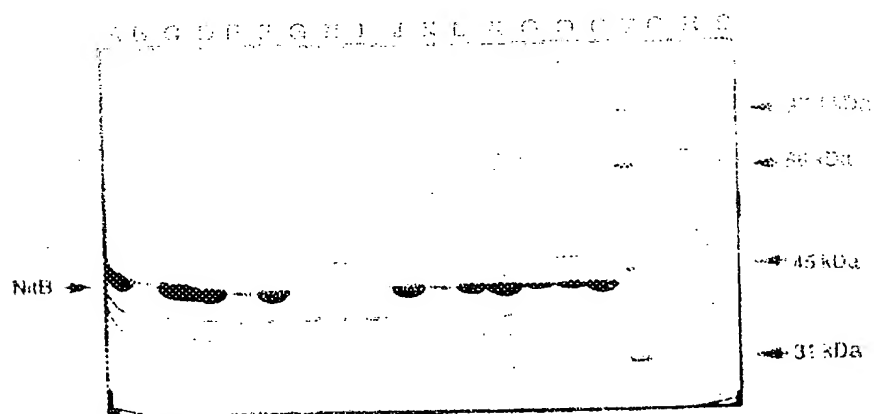
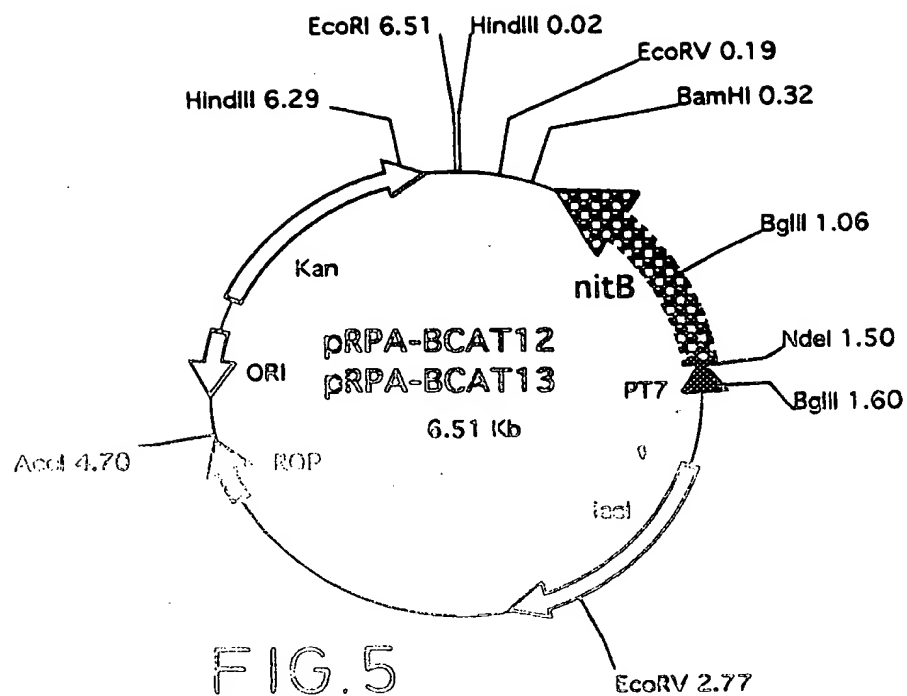


FIG. 2





**FIG. 4**



5/7

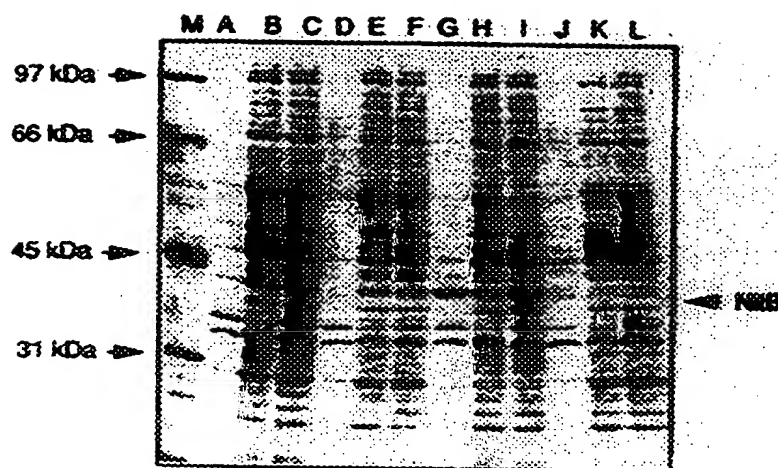


FIG. 7

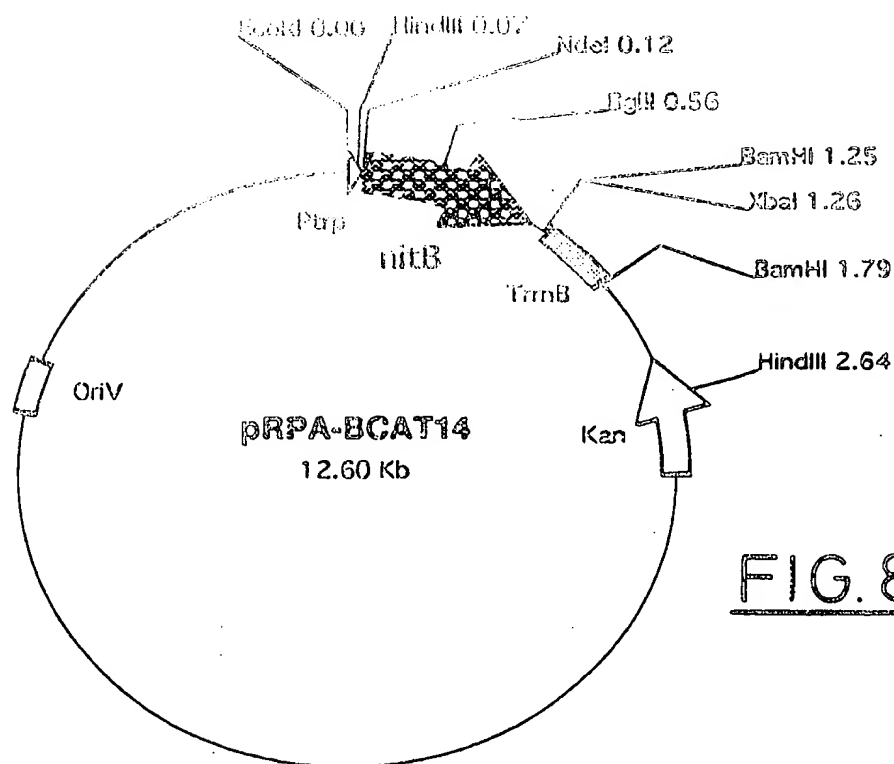


FIG. 8

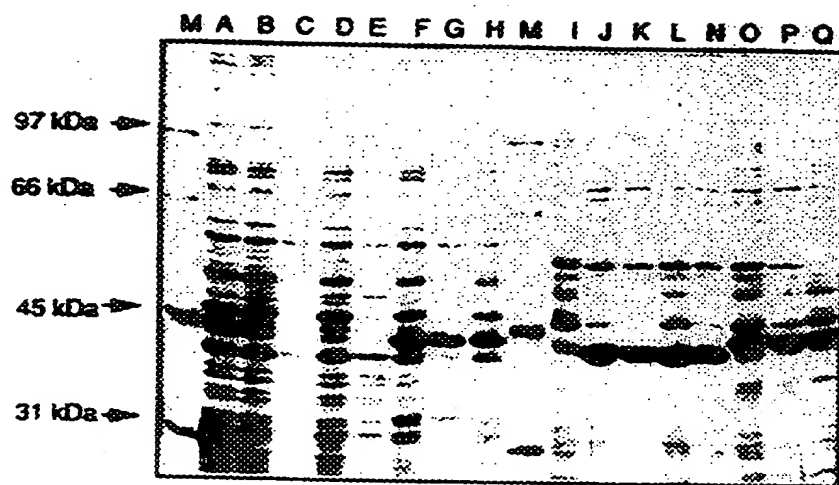


FIG. 9

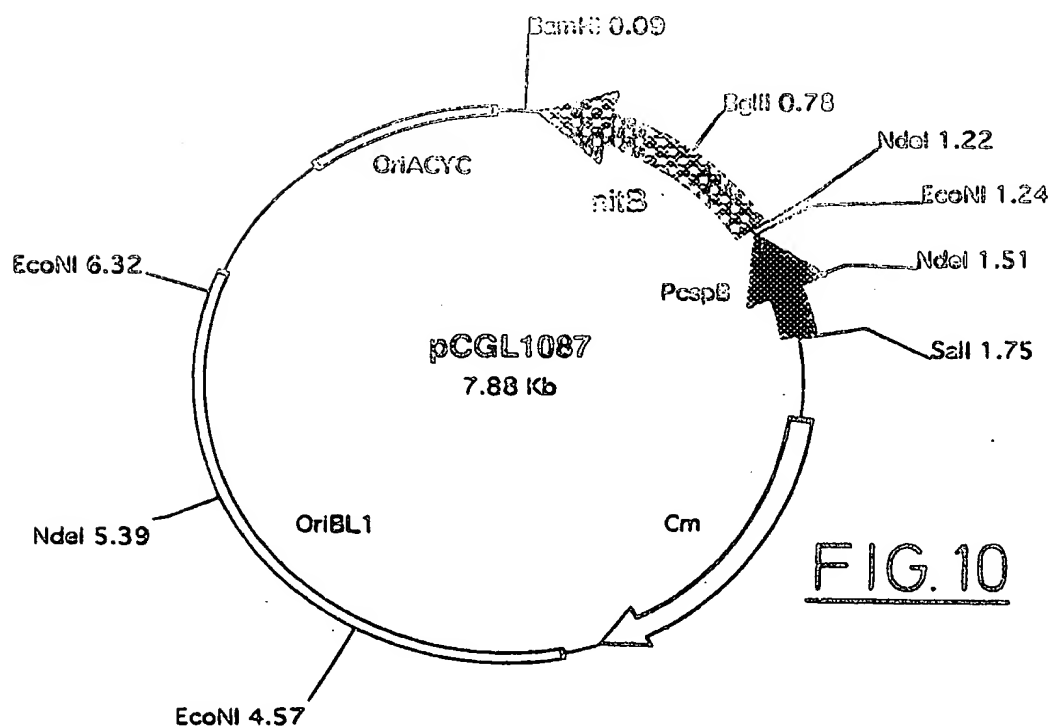
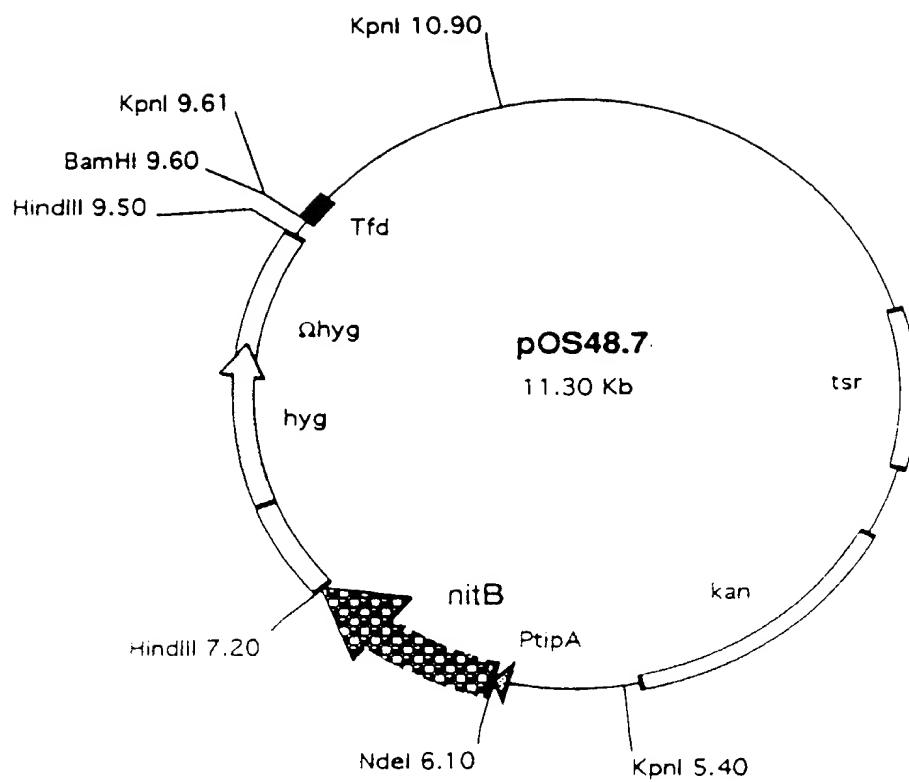


FIG. 10

FIG. 11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01913

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C12N15/55 C12P11/00 C12M1/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 09403 A (RHONE POULENC NUTRITION ANIMAL ; FAVRE BULLE OLIVIER (FR); BONTUOX) 28 March 1996 cited in the application	1-4, 8-10, 12, 13, 21, 22
Y	see the whole document  en particulier page 4, lignes 10-17 ---	5-7, 11, 14-20, 23
A	WO 91 08287 A (NOVONORDISK AS) 13 June 1991 see claim 10  --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 1998

Date of mailing of the international search report

10/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01913

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 7826 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A97, AN 78-46792A XP002036847 & JP 53 056 385 A (AJINOMOTO KK) , 22 May 1978 see abstract ---	11
Y	EP 0 206 687 A (NOVO INDUSTRI AS) 30 December 1986 see the whole document ---	14
Y	EP 0 089 165 A (PURIFICATION ENG) 21 September 1983 see the whole document ---	15
Y	EP 0 237 620 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 23 September 1987 see the whole document ---	16-18
Y	EP 0 731 079 A (DAICEL CHEM) 11 September 1996 see page 6, line 12 - page 7, line 4 ---	16-20
Y	M. KOBAYASHI ET AL: "Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid....." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, January 1993, WASHINGTON US, pages 247-251, XP002036846 cited in the application see the whole document -----	5-7, 23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9609403 A	28-03-96	FR 2724931 A	29-03-96
		FR 2731438 A	13-09-96
		AU 3476495 A	09-04-96
		CA 2200100 A	28-03-96
		CZ 9700844 A	11-06-97
		EP 0782629 A	09-07-97
		FI 971198 A	21-03-97
		PL 319298 A	04-08-97
		SK 37697 A	08-10-97
WO 9108287 A	13-06-91	AT 124720 T	15-07-95
		CA 2066686 A	24-05-91
		DE 69020741 D	10-08-95
		DE 69020741 T	21-03-96
		EP 0502035 A	09-09-92
		JP 5501499 T	25-03-93
		US 5279948 A	18-01-94
EP 0206687 A	30-12-86	DK 269285 A	15-12-86
		JP 62055083 A	10-03-87
		KR 9404542 B	25-05-94
		US 4892825 A	09-01-90
		US RE33441 E	13-11-90
EP 0089165 A	21-09-83	US 4436813 A	13-03-84
		US 4732851 A	22-03-88
		AU 561899 B	21-05-87
		AU 1212183 A	22-09-83
		DE 3382425 A	14-11-91
		JP 2051710 C	10-05-96
		JP 7071490 B	02-08-95
		JP 58170480 A	07-10-83
		JP 2101478 C	22-10-96
		JP 5344898 A	27-12-93
		JP 8002311 B	17-01-96
		CA 1209503 A	12-08-86
		US 4600692 A	15-07-86
		US 4650755 A	17-03-87
EP 0237620 A	23-09-87	DE 3542861 A	11-06-87



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0237620 A		JP 62133092 A	16-06-87
		US 4828993 A	09-05-89
EP 0731079 A	11-09-96	JP 8245495 A	24-09-96
		CN 1138020 A	18-12-96
		JP 9067296 A	11-03-97

# RAPPORT DE RECH HE INTERNATIONALE

Der internationale No  
PCT/FR 97/01913

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12N15/55 C12P11/00 C12M1/40

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12P C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 09403 A (RHONE POULENC NUTRITION ANIMAL ; FAVRE BULLE OLIVIER (FR); BONTOUX) 28 mars 1996 cité dans la demande	1-4, 8-10, 12, 13, 21, 22
Y	voir le document en entier	5-7, 11, 14-20, 23
A	en particulier page 4, lignes 10-17 --- WO 91 08287 A (NOVONORDISK AS) 13 juin 1991 voir revendication 10 --- -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

**\* Catégories spéciales de documents cités:**

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 février 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/02/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van der Schaal, C

# RAPPORT DE REC CHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/01913

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DATABASE WPI  Section Ch, Week 7826  Derwent Publications Ltd., London, GB;  Class A97, AN 78-46792A  XP002036847  &amp; JP 53 056 385 A (AJINOMOTO KK) , 22 mai 1978  voir abrégé</p>	11
Y	<p>EP 0 206 687 A (NOVO INDUSTRI AS) 30 décembre 1986  voir le document en entier</p>	14
Y	<p>EP 0 089 165 A (PURIFICATION ENG) 21 septembre 1983  voir le document en entier</p>	15
Y	<p>EP 0 237 620 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 23 septembre 1987  voir le document en entier</p>	16-18
Y	<p>EP 0 731 079 A (DAICEL CHEM) 11 septembre 1996  voir page 6, ligne 12 - page 7, ligne 4</p>	16-20
Y	<p>M. KOBAYASHI ET AL: "Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid....."  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,  vol. 90, janvier 1993, WASHINGTON US,  pages 247-251, XP002036846  cité dans la demande  voir le document en entier</p>	5-7,23

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Henseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De internationale No

PCT/FR 97/01913

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9609403 A	28-03-96	FR 2724931 A	29-03-96
		FR 2731438 A	13-09-96
		AU 3476495 A	09-04-96
		CA 2200100 A	28-03-96
		CZ 9700844 A	11-06-97
		EP 0782629 A	09-07-97
		FI 971198 A	21-03-97
		PL 319298 A	04-08-97
		SK 37697 A	08-10-97
WO 9108287 A	13-06-91	AT 124720 T	15-07-95
		CA 2066686 A	24-05-91
		DE 69020741 D	10-08-95
		DE 69020741 T	21-03-96
		EP 0502035 A	09-09-92
		JP 5501499 T	25-03-93
		US 5279948 A	18-01-94
EP 0206687 A	30-12-86	DK 269285 A	15-12-86
		JP 62055083 A	10-03-87
		KR 9404542 B	25-05-94
		US 4892825 A	09-01-90
		US RE33441 E	13-11-90
EP 0089165 A	21-09-83	US 4436813 A	13-03-84
		US 4732851 A	22-03-88
		AU 561899 B	21-05-87
		AU 1212183 A	22-09-83
		DE 3382425 A	14-11-91
		JP 2051710 C	10-05-96
		JP 7071490 B	02-08-95
		JP 58170480 A	07-10-83
		JP 2101478 C	22-10-96
		JP 5344898 A	27-12-93
		JP 8002311 B	17-01-96
		CA 1209503 A	12-08-86
		US 4600692 A	15-07-86
		US 4650755 A	17-03-87
EP 0237620 A	23-09-87	DE 3542861 A	11-06-87

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: [redacted] Internationale No

PCT/FR 97/01913

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0237620 A		JP 62133092 A US 4828993 A	16-06-87 09-05-89
EP 0731079 A	11-09-96	JP 8245495 A CN 1138020 A JP 9067296 A	24-09-96 18-12-96 11-03-97

